

# **Transfer RNA von *Drosophila melanogaster*: Ein Beitrag zu Struktur und Evolution**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung der  
Philosophischen Doktorwürde  
vorgelegt der  
**PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II  
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH**

von  
**MARTIN ALTWEGG**  
aus Wädenswil (ZH) und Guntershausen (TG)

**Begutachtet von den Herren**

**PD Dr. E. Kubli und  
Prof. Dr. P.S. Chen**

**ADAG Administration & Druck AG**

**Zürich 1980**



# **Transfer RNA von *Drosophila melanogaster*: Ein Beitrag zu Struktur und Evolution**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung der  
Philosophischen Doktorwürde  
vorgelegt der  
**PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II  
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH**

von  
**MARTIN ALTWEGG**  
aus Wädenswil (ZH) und Guntershausen (TG)

Begutachtet von den Herren

PD Dr. E. Kubli und  
Prof. Dr. P.S. Chen

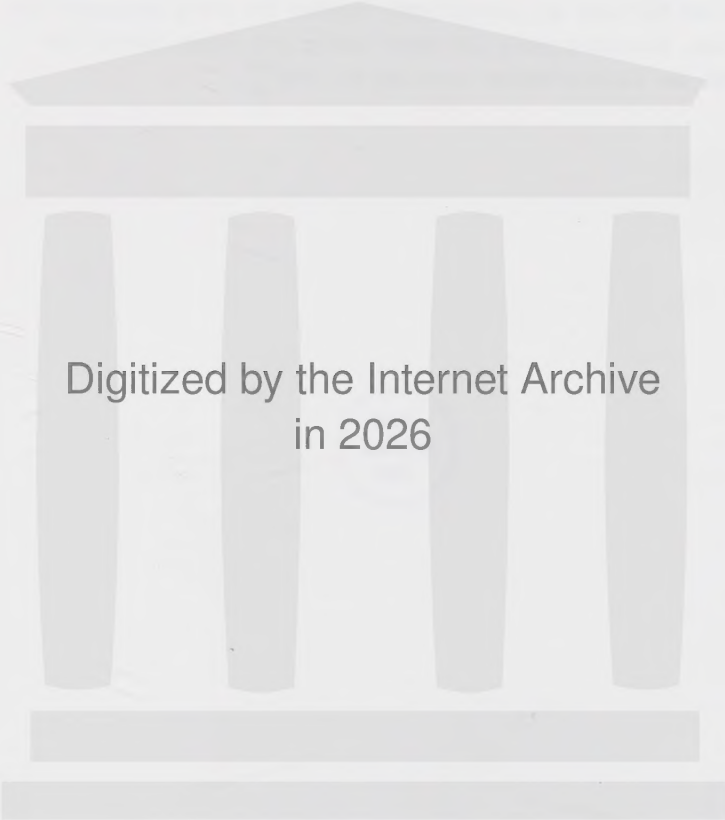
**ADAG Administration & Druck AG**

**Zürich 1980**



Meinem verehrten Lehrer, Herrn PD Dr. E. Kubli, danke ich herzlich für die Leitung und Förderung dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. P.S. Chen für das Interesse, das er ihr entgegenbrachte.

Mein Dank gilt ferner Prof. Dr. D. Söll und Dr. S. Silverman für die Betreuung während meines Aufenthaltes in New Haven, sowie allen Kolleginnen und Kollegen am Zoologischen Institut für viele anregende Diskussionen. Besonders danke ich Robert Dudler und Thomas Schmidt für die tRNA aus unbefruchteten Eiern und für tRNA<sup>Val</sup><sub>3b</sub>.



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41507202\\_0059](https://archive.org/details/IA41507202_0059)

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Einleitung                                                                                                                                                                         | 1  |
| II. Material und Methoden                                                                                                                                                             | 5  |
| 1. Versuchstiere                                                                                                                                                                      | 5  |
| 2. Isolation der tRNA                                                                                                                                                                 | 5  |
| 3. Isolation der Synthetasen und Aminoacylierung                                                                                                                                      | 5  |
| 4. Affinitätschromatographie                                                                                                                                                          | 5  |
| 5. RPC-5 - Chromatographie                                                                                                                                                            | 7  |
| 6. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                                                                                                                   | 8  |
| 7. Sequenzierung                                                                                                                                                                      | 8  |
| 7.1. 5'-End - Markierung                                                                                                                                                              | 8  |
| 7.2. 3'-End - Markierung                                                                                                                                                              | 10 |
| 7.3. Fingerprints                                                                                                                                                                     | 10 |
| 7.4. Stanley-Vassilenko-Gele                                                                                                                                                          | 11 |
| 7.5. Dünnschichtchromatographie                                                                                                                                                       | 11 |
| 7.6. Sequenzanalyse endmarkierter Fragmente                                                                                                                                           | 12 |
| 7.7. Spezifische Spaltung bei $m^7G$                                                                                                                                                  | 15 |
| 7.8. Nuklease $S_1$ -Verdauungen                                                                                                                                                      | 15 |
| III. Resultate                                                                                                                                                                        | 17 |
| 1. Transfer RNA <sup>Phe</sup>                                                                                                                                                        | 17 |
| 1.1. Isolation mittels Affinitätschromatographie                                                                                                                                      | 17 |
| 1.2. Isolation mittels RPC-5 - Chromatographie und<br>zweidimensionaler Gelelektrophorese                                                                                             | 17 |
| 1.3. Nachweis von vier Isoakzeptoren                                                                                                                                                  | 19 |
| 1.4. Sequenzanalyse                                                                                                                                                                   | 19 |
| 1.5. Veränderungen des Isoakzeptormusters während<br>der Ontogenese                                                                                                                   | 23 |
| 2. Transfer RNA <sup>Glu</sup>                                                                                                                                                        | 26 |
| 2.1. Isolation                                                                                                                                                                        | 26 |
| 2.2. Sequenzierung                                                                                                                                                                    | 26 |
| 3. Isolation von tRNA <sup>His</sup> , tRNA <sup>Met</sup> <sub>i</sub> , tRNA <sup>Arg</sup> <sub>2</sub> , tRNA <sup>Gly</sup> <sub>3</sub><br>und tRNA <sup>Ala</sup> <sub>5</sub> | 29 |

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. Isolation von tRNA <sup>Ser</sup> und tRNA <sup>Asn</sup>                                                                                                                                              | 31 |
| 5. Sequenzierung von tRNA <sup>His</sup>                                                                                                                                                                  | 32 |
| 6. Sequenzierung von tRNA <sup>Met</sup> <sub>i</sub>                                                                                                                                                     | 34 |
| 7. Partielle Sequenzen von tRNA <sup>Arg</sup> <sub>2</sub> , tRNA <sup>Gly</sup> <sub>3</sub> , tRNA <sup>Val</sup> <sub>3b</sub> ,<br>tRNA <sup>Asn</sup> , tRNA <sup>Ser</sup> und tRNA <sup>Asp</sup> | 35 |
| IV. Diskussion                                                                                                                                                                                            | 37 |
| 1. Isolation von tRNA's                                                                                                                                                                                   | 37 |
| 2. Sequenzierungsmethodik                                                                                                                                                                                 | 38 |
| 3. Transfer RNA <sup>Phe</sup>                                                                                                                                                                            | 40 |
| 4. Transfer RNA <sup>Glu</sup>                                                                                                                                                                            | 42 |
| 5. Transfer RNA <sup>His</sup>                                                                                                                                                                            | 42 |
| 6. Transfer RNA <sup>Met</sup> <sub>i</sub>                                                                                                                                                               | 43 |
| 7. Modifikation und Alterung                                                                                                                                                                              | 44 |
| 8. Modifikationen auf der 3'-Seite des Anticodons                                                                                                                                                         | 45 |
| 9. Transfer RNA und Evolution                                                                                                                                                                             | 48 |
| 9.1. Transfer RNA <sup>Glu</sup>                                                                                                                                                                          | 50 |
| 9.2. Transfer RNA <sup>Lys</sup>                                                                                                                                                                          | 51 |
| 9.3. Transfer RNA <sup>Arg</sup>                                                                                                                                                                          | 52 |
| 9.4. Konvergente Entwicklungen                                                                                                                                                                            | 53 |
| 9.5. Konstanz von tRNA-Sequenzen bei Eukaryonten                                                                                                                                                          | 54 |
| V. Zusammenfassung                                                                                                                                                                                        | 56 |
| VI. Abkürzungen                                                                                                                                                                                           | 57 |
| VII. Literaturverzeichnis                                                                                                                                                                                 | 58 |

## I. EINLEITUNG

Genexpression ist abhängig von einer korrekten Uebertragung der in der DNA gespeicherten genetischen Information in RNA und in Proteine. Eine Schlüsselrolle spielen dabei die transfer-Ribonukleinsäuren, die mit ihrer doppelten Spezifität das Bindeglied zwischen messenger RNA und Proteinen im Verlauf der Translation darstellen. Das Anticodon der tRNA interagiert mit dem entsprechenden komplementären Triplet der mRNA, während die am 3'-Ende gebundene Aminosäure in die wachsende Polypeptidkette eingebaut wird.

Von mehr als 130 tRNA's ist die Primärstruktur bekannt (Sprinzl et al., 1980). Sie lassen sich alle in die bekannte Kleeblattstruktur (Holley et al., 1965) falten, die sich in einen Aminoacyl-Stamm, einen Dihydrouridin-Arm, einen Anticodon-Arm, eine variable Schleife von unterschiedlicher Länge und einen TΨC-Arm gliedern lässt. Transfer RNA's zeichnen sich ferner aus durch einen hohen Gehalt an seltenen Nukleotiden, die häufig ortsspezifisch sind (Nishimura, 1978). Mit Ausnahme der Base Q (Farkas and Jacobson, 1980) entstehen wahrscheinlich alle durch Modifikation eines der vier Hauptnukleotide (Söll, 1971). Ueber ihre Funktion ist relativ wenig bekannt. Singer et al. (1972) haben gezeigt, dass tRNA<sup>His</sup> von einer Salmonella-Mutante, in welcher die Histidinsynthese durch Zugabe von Histidin nicht reprimiert wird, die Sequenz U-U im Bereich des Anticodon-Stammes enthält, während beim Wildtyp die Sequenz Ψ-Ψ nachgewiesen werden kann. Pseudouridin scheint für diesen Regulationsprozess eine Voraussetzung zu sein. Modifikationen auf der 3'-Seite des Anticodons können mit der Sequenz des Anticodons korreliert werden und dürften eine korrekte Paarung Codon-Anticodon erleichtern (Nishimura, 1978). Auch die Modifikationen in der ersten Position des Anticodons (Wobble-Position) beeinflussen die Codon-Anticodon-Interaktion, indem sie das Wobbling einschränken oder erweitern können (Crick, 1968; Kobayashi et al., 1974). Des weiteren sind zusätzliche Methylierungen in Tumorzellen nachgewiesen worden, ohne dass aber über deren Auswirkungen Aussagen gemacht werden können (Kuchino and Borek, 1978).

Vermutlich werden fasst alle RNA's als Vorläufer synthetisiert und durch spezifische Enzyme zu ihren funktionellen Endprodukten abgebaut (Perry, 1976).

Transfer RNA-Vorläufer wurden erstmals in Säugerzellen festgestellt, doch sind die Einzelheiten der Biosynthese bei Prokaryonten erarbeitet worden (Altman and Smith, 1971; Schedl and Primakoff, 1973; Sakano and Shimura, 1975; Vögeli et al., 1975). Die Maturation von Vorläufern umfasst im wesentlichen die Entfernung von Extranukleotiden am 3'- und am 5'-Ende, die Modifikation von Nukleotiden und eventuell das Anhängen des CCA-Endes, sofern es im primären Transkriptionsprodukt noch nicht enthalten ist (Deutscher et al., 1974).

Neben der Hauptaufgabe der transfer-Ribonukleinsäuren in der ribosomalen Proteinsynthese sind etliche andere Prozesse entdeckt worden, an denen tRNA's beteiligt sind (LaRossa and Söll, 1978). Bei Prokaryonten ist der "stringent control"-Mechanismus bekannt (Gallant and Lazzarini, 1976). Besetzt eine unbeladene tRNA den A-site des Ribosoms wird die Synthese von (p)ppGpp stimuliert. Als Folge davon wird die Transkription der Gene für rRNA, tRNA und ribosomale Proteine gedrosselt, währenddem einige Operons für die Biosynthese von Aminosäuren aktiviert werden. Ferner ist sowohl für prokaryontische als auch für eukaryontische Organismen gezeigt worden, dass Aminoacyl-tRNA's Operons für die Biosynthese von verschiedenen Aminosäuren regulieren (Messenguy and Delforge, 1976; Cortese, 1979). Hamilton and Litt (1976) vermuten auch, dass die tRNA-Synthese in Säugerzellen durch die relativen Mengen acylierter und deacylierter tRNA reguliert werden könnte. Transfer RNA's sind aber nicht nur bei der Proteinsynthese und verschiedenen Regulationsphänomenen beteiligt. Sie haben auch eine wichtige Funktion bei der Biosynthese von Aminoacylphosphatidylglycerol (Nesbitt and Lennarz, 1968) und von Glycylipopolysacchariden (Gentner and Berg, 1971), bei der terminalen Addition von Aminosäuren an Proteine unabhängig vom Proteinsyntheseapparat (Deutch et al., 1977) und bei der Zellwandsynthese (Roberts, 1972). Ferner kann tRNA als "primer" für die Retrotranskriptase dienen (Dahlberg et al., 1974; Haseltine et al., 1977).

Ein Ziel der heutigen Forschung ist es, die Entwicklung eines Organismus in molekularen Begriffen verstehen zu können. Dabei ist die Regulation der beteiligten Gene von zentraler Bedeutung. Im Gegensatz zu den Prokaryonten ist bei Eukaryonten über Regulationsphänomene sehr wenig bekannt. Dies ist auf die enorme Komplexität der untersuchten Organismen zurückzuführen, weshalb eine Beschränkung auf relativ einfache Gensysteme

angezeigt ist. Ein solches System stellen sicher die transfer-Ribonukleinsäuren dar. Einerseits ist ihre primäre Funktion bekannt, andererseits können die Genprodukte recht einfach isoliert und charakterisiert werden.

Für Untersuchungen von Organisation, Struktur und Funktion von tRNA-Genen und deren Produkte ist *Drosophila melanogaster* hervorragend geeignet. Durch "in situ"-Hybridisierung können tRNA-Gene auf den polytären Chromosomen der Speicheldrüse lokalisiert werden (Grigliatti et al., 1974; Kubli and Schmidt, 1978; Schmidt et al., 1978). Auch ist eine enorme Zahl von Mutanten beschrieben worden und genetische Techniken erlauben eine fast unbeschränkte Manipulation des Genoms, z.B. Einführung von Defizienzen und Duplikationen (Lindsley and Grell, 1972; Lindsley et al., 1972; Zimm and Lindsley, 1976). Plasmiden, die *Drosophila*-DNA enthalten, ermöglichen eine Kartierung und Sequenzierung von tRNA-Genen (Yen et al., 1977; Hosbach et al., 1980; Hovemann et al., 1980) sowie das Studium von Transkription und Processing von tRNA-Vorläufern "in vitro" (Silverman et al., 1979). All diese Untersuchungen erfordern jedoch eine genaue Analyse derjenigen tRNA's, die im Cytoplasma auftauchen, denn sowohl Hybridisierungsexperimente als auch Gensequenzen können keinen Aufschluss darüber geben, ob die betreffenden Gene wirklich exprimiert werden und welchen Isoakzeptoren sie entsprechen würden. So haben Hosbach et al. (1980) mit tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub> Plasmiden identifiziert, wobei Sequenzanalysen dann aber zeigten, dass auf einem Abschnitt von mindestens 12 Kilobasen kein einziges tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub>-Gen vorhanden war, sondern nur tRNA<sup>Glu</sup>-Gene, die sich in 6 (resp. 7) Nukleotiden von tRNA<sup>Glu</sup> unterscheiden. Ebenfalls eine Kreuzhybridisierung ist für einen tRNA<sup>Met</sup><sub>4</sub>-Plasmiden mit 3 identischen tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub>-Genen gefunden worden, deren Sequenz sich von der cytoplasmatischen tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub> jedoch in einem Nukleotid unterscheidet (D. Söll, persönliche Mitteilung). Die Sequenzierung reifer, voll modifizierter tRNA's muss also als absolute Voraussetzung für biologisch sinnvolle Versuche zur Expression von tRNA-Genen betrachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb einige tRNA's isoliert und sequenziert. Für die Auswahl der untersuchten tRNA's spielten verschiedene Kriterien eine Rolle, wichtig war vor allem die möglichst einfache, rasche und auch spezifische Isolation. Die mittels Affinitätschromatographie isolierbaren tRNA's (tRNA<sup>Phe</sup> und tRNA<sup>Glu</sup>) bieten diese Vorteile, können doch ganz bestimmte Isoakzeptoren in einem einzigen Schritt praktisch rein dar-

gestellt werden. Gleichzeitig können auch die dazugehörigen Vorläufer isoliert werden, sofern diese die richtige Anticodonkonformation bereits aufweisen (Grosjean et al., 1973; Vögeli et al., 1975).

Die Q-Basen-haltigen  $\text{tRNA}^{\text{Asp}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Asn}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{His}}$  zeigen eine parallele Veränderung ihrer Isoakzeptoren während Entwicklung und Alterung (White et al., 1973; Hosbach and Kubli, 1979). Dies widerspiegelt möglicherweise eine Adaptation an die zahlenmässige Verteilung der verschiedenen Codonen, um eine gleichbleibend effiziente Translation zu gewährleisten. Eine solche Adaptation der relativen Mengen von Isoakzeptoren ist für die hintere Seidendrüse von *Bombyx mori* zur Zeit der Fibroinproduktion nachgewiesen (Chavancy and Daillie, 1971). Dass die Q-Base besondere Funktionen haben könnte, zeigt sich auch in Temperatursprungexperimenten (Grosjean et al., 1978), in denen die Stabilität von Anticodon-Anticodon-Interaktionen untersucht wurde. Dabei stellte sich heraus, dass die Stabilität eines Q-U Basenpaares drei Mal grösser ist als diejenige eines G-U Paares. Auch die Beobachtung, dass  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}_{\text{-Q}}$  von *Drosophila melanogaster* im Gegensatz zu  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}_{\text{+Q}}$  Stopcodonen lesen kann, wenn sie zusammen mit TMV-RNA in *Xenopus*-Oocyten injiziert wird, deutet in diese Richtung (M. Bienz, persönliche Mitteilung). Aus der Familie der Q-Basen-haltigen tRNA's ist  $\text{tRNA}^{\text{His}}$  für die Sequenzierung ausgelesen worden.

In jüngster Zeit werden immer häufiger auch biochemische Daten herangezogen, um evolutive Entwicklungen aufzuzeigen (Fitch and Margoliash, 1967; Denis and Wegnez, 1978; Dillon, 1978; Cedergren et al., 1980; Fox et al., 1980). Die hier bestimmten tRNA-Sequenzen sollen auch in dieser Richtung interpretiert werden, wobei vor allem die Hypothese von Dillon (1978) überprüft werden soll.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden bei 25°C auf Standardfutter (Mais-Zucker-Hefe-Agar) gezüchtete Fliegen von *Drosophila melanogaster* (Stamm Oregon) verwendet. Die Tiere waren zwischen 5 und 15 Tage alt und wurden bis zur Extraktion der RNA bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Unbefruchtete Eier (Nöthiger and Labhart, 1980) waren ein Geschenk von Robert Dudler.

### 2. Isolation der tRNA

Die RNA wurde nach der Methode von Kirby (1956) extrahiert. Die Reinigung der tRNA erfolgte durch Ausfällung der hochmolekularen RNA mit Kaliumacetat (Kern, 1975) und Chromatographie auf Sephadex G-100 (White and Tener, 1973).

### 3. Isolation der Synthetasen und Aminoacylierung

Die Isolation der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erfolgt nach den Angaben von Olexa (1977). Die Aminoacylierungsbedingungen entsprachen denjenigen von White and Tener (1973).

### 4. Affinitätschromatographie

Eine ausgezeichnete Methode zur Isolation spezifischer tRNA's bietet die Anticodon-Anticodon-Affinitätschromatographie (Grosjean et al., 1973), wobei der Komplex zwischen tRNA<sup>Glu</sup> und tRNA<sup>Phe</sup> wegen seiner besonderen Stärke am geeignetsten ist. Diese für prokaryontische tRNA's erprobte Methode konnte erfolgreich auf die tRNA von *Drosophila* übertragen werden (Altwegg et al., 1978).

Transfer RNA's mit komplementären Anticodonen bilden bei niedriger Temperatur und Anwesenheit von Magnesiumionen einen ziemlich stabilen

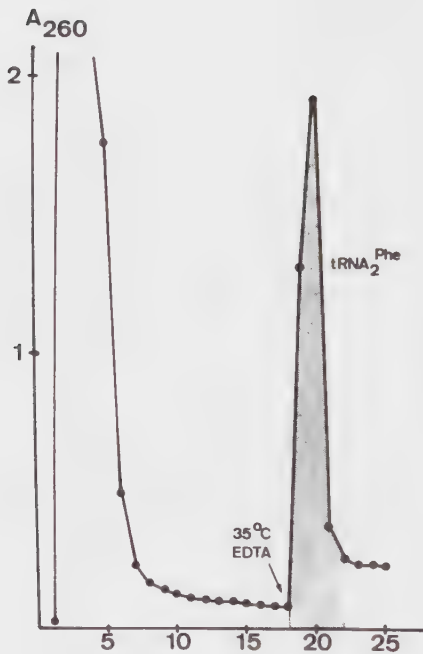


Abb. 1: Affinitätschromatographie von unfractionierter tRNA auf einer Säule mit matrixgebundener  $tRNA^{Glu}$  von E.coli

Komplex, der durch Temperaturerhöhung und Zugabe von EDTA wieder gelöst werden kann. Auf einer Säule mit matrixgebundener  $tRNA_2^{Glu}$  von E.coli (Boehringer) wurden 100  $A_{260}$ -Einheiten unfractionierter tRNA von *Drosophila* in Puffer A-1 bei 0°C aufgetragen und so lange gespült, bis alle tRNA's ohne komplementäres Anticodon ausgewaschen und fast keine Absorption bei 260 Nanometern mehr festzustellen war. Die komplexierte  $tRNA^{Phe}$  wurde dann bei 35°C in Puffer A-2 eluiert (Abb. 1) und mit 2,5 Volumen Äthanol ausgefällt. Die Affinitätssäule wurde in Puffer A-3 aufbewahrt, wobei zur Verhinderung von Bakterienwachstum ein Tropfen Chloroform zu-

Puffer A-1: 10mM NaAcetat, pH 5,5; 10mM  $\text{MgSO}_4$ ; 135mM NaCl

Puffer A-2: 10mM NaAcetat, pH 4,8; 10mM EDTA; 135mM NaCl

Puffer A-3: 10mM NaAcetat, pH 4,8; 10mM  $\text{MgSO}_4$ ; 1M NaCl

Tabelle 1: Pufferlösungen für die Affinitätschromatographie

zugegeben wurde.

Für die Isolation von tRNA<sup>Glu</sup> wurde eine Säule mit matrixgebundener tRNA<sup>Phe</sup> von Hefe (Boehringer) verwendet, ansonsten kam das genau gleiche Verfahren zu Anwendung.

5. RPC-5 - Chromatographie

Für die analytische und präparative Chromatographie von tRNA auf RPC-5 wurde das von Hosbach (1977) beschriebene System von Pearson et al. (1971) mit einer Säule von 0,9 x 64 cm und einem 200 ml Salzgradienten von 0,55 bis 0,8 M NaCl in zwei verschiedenen Puffersystemen (Tab. 2) verwendet.

Puffer R-1: 10mM NaAcetat, pH 4,5; 10mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1mM 2-mercapto-  
aethanol  
(Grigliatti et al., 1974)

Puffer R-2: 10mM NaFormiat, pH 3,8; 1mM EDTA; 1mM 2-mercapto-  
aethanol  
(Dunn et al., 1978)

Tabelle 2: Pufferlösungen für die RPC-5 - Chromatographie

## 6. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Blatt and Feldmann, 1973) wurde die Anleitung von Egg (1978) im Detail befolgt. Die tRNA wurde mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) gefärbt und unter UV sichtbar gemacht. Ausgeschnittene Gelstücke wurden in einer zugeschmolzenen und mit einem Glaswattepfropf versehenen Eppendorfspitze zermörsert, über Nacht bei 37°C in 500 µl TNE-Puffer (0,1M Tris-HCl, pH 7,5; 0,5M NaCl, 1mM EDTA) inkubiert, nach Abschneiden der Spitze zentrifugiert und die tRNA mit 2,5 Volumen Aethanol ausgefällt (Matouschek, 1979).

## 7. Sequenzierung

Eine ausgezeichnete Methode für die Sequenzierung unmarkierter RNA ist von Silberklang et al. (1979) ausgearbeitet worden. Sie basiert auf der Möglichkeit, Oligo- und Polynucleotide mittels ( $^{32}\text{P}$ )- $\gamma$ -ATP und Polynukleotidkinase an deren 5'-Ende zu sehr hohen spezifischen Aktivitäten markieren zu können. Problematisch bleibt jedoch die eindeutige Bestimmung von modifizierten Nukleotiden, die in tRNA's sehr häufig vorkommen.

Mit der von Stanley und Vassilenko (1978) entwickelten Sequenzierungstechnik mittels Gelelektrophorese wird es einerseits möglich, die modifizierten Nukleotide direkt zu bestimmen, andererseits bietet sie eine einfache Möglichkeit, sequenzierte Fragmente einzuordnen.

Die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten "in vitro" - Methoden sind in der Originalliteratur so umfassend beschrieben, dass sich hier eine ausführliche Wiederholung erübrigt, sofern die Techniken unverändert übernommen wurden. Abb. 2 gibt einen Ueberblick über die verwendeten Sequenzierungsstrategien.

### 7.1. 5'-End - Markierung

Die radioaktive Markierung am 5'-Ende mit  $^{32}\text{P}$  beruht auf der Fähigkeit von Polynukleotidkinase aus T4-infizierten E.coli (Boehringer), die Phosphatgruppe in  $\gamma$ -Stellung von ( $^{32}\text{P}$ )- $\gamma$ -ATP an 5'-OH-Gruppen sowohl von Mononukleotiden als auch von Oligo- und Polynukleotiden zu übertragen. Die Methode kann also für folgende Zwecke verwendet werden:

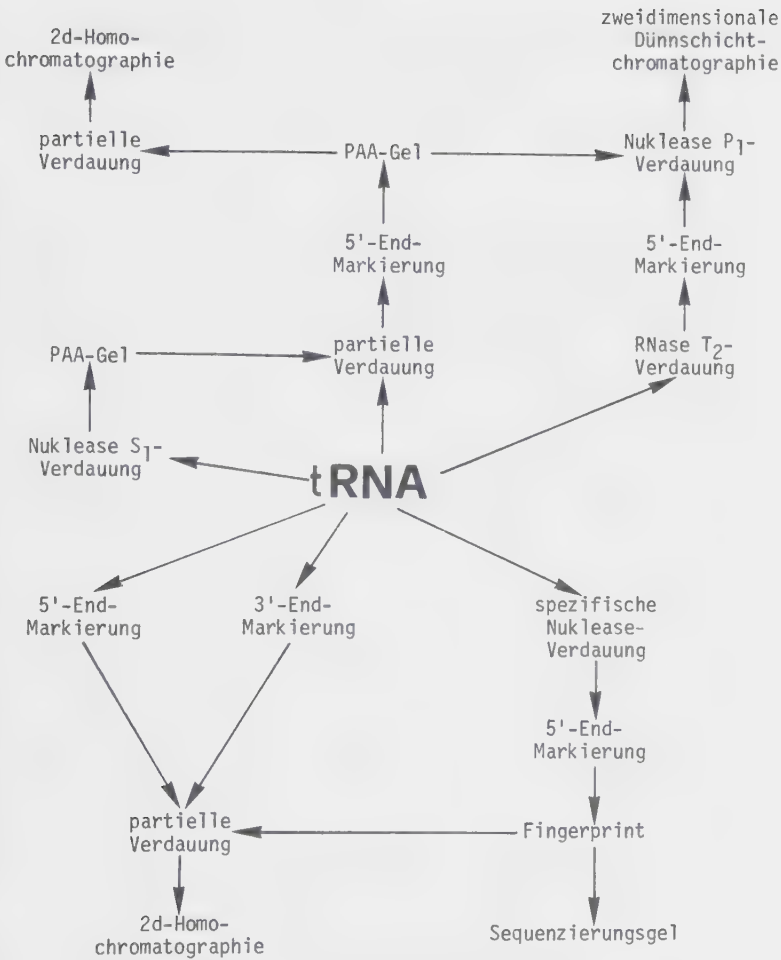


Abb. 2: Übersicht über die verwendeten Sequenzierungsmethoden

- Basenanalyse von RNA
- Markierung von Fragmenten, die durch Verdauung von tRNA mit spezifischen Nukleasen (RNase T<sub>1</sub>, RNase A) oder durch unspezifische Verdauung (Stanley und Vassilenko -Gele) gewonnen wurden
- Markierung intakter RNA

Ist das 5'-Ende mit einer Phosphatgruppe blockiert (wie im Falle der Markierung von intakter tRNA), kann diese mit alkalischer Phosphatase, die freie 5'- und 3'-Phosphate abspaltet, entfernt werden. Die Vorschriften von Silberklang et al. (1979) wurden genau befolgt.

### 7.2. 3'-End-Markierung

Für die Markierung von intakter tRNA am 3'-CCA<sub>OH</sub>-Ende wurde die Methode von Peattie (1979) übernommen. Die Reaktion erfolgte in 10µl folgender Lösung bei 0°C über Nacht:

50mM HEPES, pH 7,5  
 20mM MgCl<sub>2</sub>  
 3,3mM Dithiothreitol  
 1% Serumalbumin  
 10% Dimethylsulfoxid  
 5µM ATP

0,2 bis 2µg tRNA  
 0,5 bis 3 Einheiten RNA-Ligase (PL-Biochemicals)  
 20 bis 50pMol 5'-(<sup>32</sup>P)-pCp (New England Nuclear )

Anschliessend wurde die tRNA auf einem 20% Polyacrylamid-8M Harnstoff-Gel gereinigt.

### 7.3. Fingerprints

Durch vollständige Verdauung einer tRNA mit spezifischen RNasen (RNase T<sub>1</sub> spaltet nach G, pankreatische RNase nach Pyrimidinen) erhält man genau definierte Oligonukleotide, die anschliessend kinasiert (siehe

7.1.) und voneinander getrennt werden können. Dabei fand das unter 7.6.2. beschriebene System der zweidimensionalen Homochromatographie Verwendung. Die Fragmente wurden mit 2M TEAB eluiert und mindestens 3 Mal lyophilisiert.

#### 7.4. Stanley-Vassilenko-Gele

0,2 bis 2µg tRNA wurden während 5 Minuten bei 100°C in 10µl Wasser oder deionisiertem Formamid partiell verdaut, die Fragmente am 5'-Ende kinasiert und auf einem 20% Polyacrylamid-8M Harnstoff-Gel aufgetrennt (Stanley and Vassilenko, 1978). Alle Banden wurden ausgeschnitten, eluiert, nach Zugabe von 0,5 A<sub>260</sub> E.coli tRNA (Boehringer) zwei Mal mit 2,5 Volumen Aethanol ausgefällt und mit 5µl Nuklease P<sub>1</sub> (0,5mg/ml in 50mM NH<sub>4</sub>Acetat, pH 5,4) zu Nukleosid-5'-Monophosphaten abgebaut. Das 5'-terminale Nukleotid, das als einziges radioaktiv markiert ist, wurde mittels Dünnschichtchromatographie in zwei verschiedenen Laufmitteln (siehe unten) bestimmt.

#### 7.5. Dünnschichtchromatographie

Die Identifikation von Mononukleotiden erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie auf Cellulose-Dünnschichtplatten (Macherey-Nagel & Co.). Für Nukleosid-3'-Phosphate fand das früher beschriebene System Verwendung (Altwegg, 1977), während für Nukleosid-5'-Phosphate nach den Angaben von Silberklang et al. (1979) vorgegangen wurde. Abb. 3 zeigt die relativen Mobilitäten von einigen modifizierten Nukleotiden. Folgende Laufmittel wurden verwendet:

|                              |                                                 |        |
|------------------------------|-------------------------------------------------|--------|
| <u>1. Dimension (ISO):</u>   | Isobuttersäure                                  | 66 ml  |
|                              | konz. NH <sub>4</sub> OH                        | 1 ml   |
|                              | H <sub>2</sub> O                                | 33 ml  |
| <u>2. Dimension (PABST):</u> | 0,1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 6,8   | 100 ml |
|                              | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 60 g   |
|                              | n-Propanol                                      | 2 ml   |

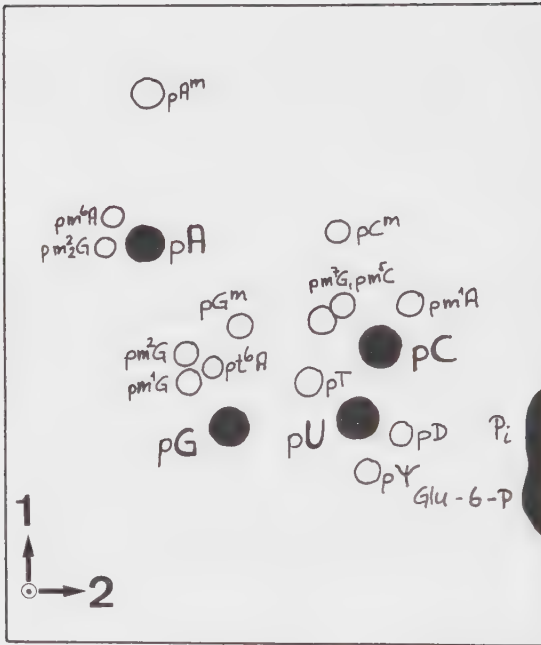


Abb. 3: Relative Mobilitäten von modifizierten 5'-Nukleosidmonophosphaten (nach Silberklang et al., 1979)

### 7.6. Sequenzanalyse endmarkierter Fragmente

Endmarkierte Oligo- oder Polynukleotide können sequenziert werden, indem man partielle Verdauungsprodukte in einem zweidimensionalen System so auftrennt, dass die "angular jumps" zwischen benachbarten Stücken einen Rückschluss auf die Natur des hinzugefügten Nukleotids erlauben.

#### 7.6.1. Partielle Verdauungen

Partielle Verdauungen von Fragmenten oder intakten tRNA's sind auf verschiedene Arten möglich. Einerseits stehen enzymatische Methoden zur

Verfügung (Silberklang et al., 1979) mit Exonukleasen (z.B. Schlangengiftphosphodiesterase, SVP) oder Endonukleasen (z.B. Nuklease  $P_1$ ), andererseits besteht eine viel weniger aufwendige Möglichkeit in der Verdauung mit Formamid oder Wasser bei hohen Temperaturen (Stanley and Vassilenko, 1978; Gupta and Randerath, 1979).

Im ersten Fall müssen nach verschiedenen Zeiten Aliquots entnommen werden, um eine Vertretung aller partiellen Produkte zu erreichen (Abb. 4), während bei Verdauung mit  $H_2O$  oder Formamid eine Standardinkubation von 45 Minuten bei  $100^{\circ}C$  eine regelmässige Verteilung liefert.

#### 7.6.2. Zweidimensionale Homochromatographie

In der ersten Dimension (Hochspannungselektrophorese auf Cellulose-Acetat bei pH 3,5) erfolgt eine Auftrennung nach Basenzusammensetzung, in der zweiten Dimension (Homochromatographie auf DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten (Macherey-Nagel & Co.) werden die Oligonukleotide nach Grösse aufgetrennt. Dies führt zu den sehr charakteristischen "angular jumps", die ein direktes Ablesen der Sequenz erlauben (Abb.5).

Diese Methode ist von Silberklang et al. (1979) nur für die enzymatischen Verdauungsprodukte beschrieben worden. Sie lässt sich aber auf die  $H_2O$ - und Formamidverdauungen übertragen, die sich dadurch auszeichnen, dass jedes Fragment eine Phosphatgruppe mehr trägt. Das Mononukleotid liegt also als Diphosphat vor, während es in der enzymatischen Analyse mit Nuklease  $P_1$  als 5'-Monophosphat auftritt. Diese zusätzliche Phosphatgruppe führt dazu, dass die Fragmente in der ersten Dimension weiter, in der zweiten Dimension etwas weniger weit wandern. Ein charakteristisches Beispiel, das diese Unterschiede

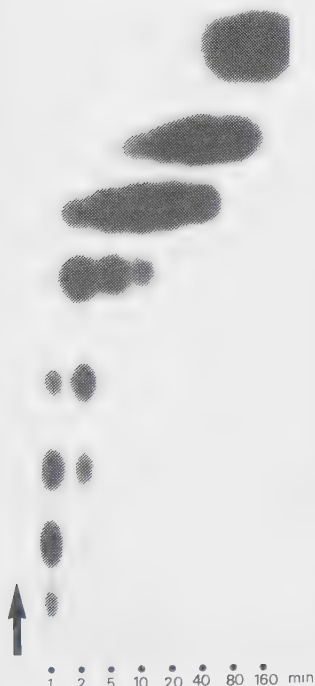


Abb. 4: Eindimensionale Analyse der partiellen Verdauungsprodukte des Fragmentes AUCUAAAG mit Schlangengiftphosphodiesterase (SVP)

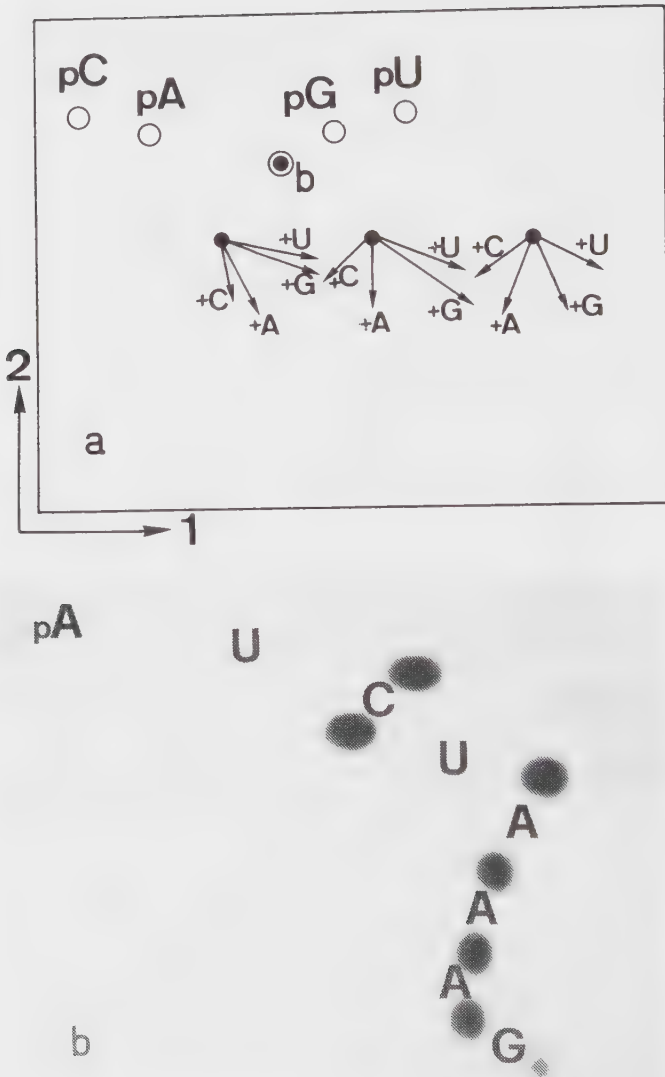


Abb. 5: Zweidimensionale Homochromatographie von partiellen Verdauungen mit Nuklease P<sub>1</sub> oder Schlangengiftphosphodiesterase: (a) schematische "angular jumps", b= blauer Farbmarker; (b) T<sub>1</sub>-Fragment von tRNA<sup>Phe</sup><sub>2</sub>

deutlich macht, zeigt Abb. 18.

Rückschlüsse auf die Anwesenheit von modifizierten Nukleotiden sind mittels zweidimensionaler Homochromatographie nur in wenigen Ausnahmefällen (z.B.  $m^7G$ ,  $m^1A$ ) möglich.

#### 7.6.3. Hochspannungselektrophorese

Mehr Informationen über modifizierte Nukleotide ergibt die elektrophoretische Auftrennung von partiellen Verdauungsprodukten auf DEAE-Papier bei pH 3,5 und pH 1,9. Die relativen Mobilitäten erlauben eine Identifikation von Nukleotiden, wobei wegen der nicht allzu guten Reproduzierbarkeit ein Marker mit der gleichen Sequenz wie das untersuchte Fragment verfügbar sein sollte (Brownlee, 1972; Silberklang et al., 1979).

#### 7.6.4. Sequenzierungsgele

Für die Sequenzierung längerer Fragmente bietet sich auch die gelelektrophoretische Analyse von partiellen Verdauungen mit spezifischen Nukleasen an. Parallele Verdauungen mit RNase  $T_1$ , RNase  $U_2$  und RNase von Physarum ergeben zusammen mit einer Formamid-Leiter die nötigen Informationen.

#### 7.7. Spezifische Spaltung bei $m^7G$

Das Prozedere ist eine Modifikation der von Silberklang et al. (1979) beschriebenen Methode.

Zu  $4\mu g$  tRNA wurden  $5\mu l$  50mM NaOH zugegeben und für 15 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, gefolgt von einer Zugabe von  $1\mu l$  0,4M Essigsäure und  $5\mu l$  0,3N Anilin-HCl, pH 4,5. Nach 4 Stunden bei  $37^\circ C$  wurde die Probe mit  $40\mu l$  Wasser verdünnt und auf eine kleine DEAE-Cellulose-Säule (äquilibriert mit 50mM TEAB) aufgetragen. Die Fragmente wurden mit 2M TEAB eluiert und drei Mal lyophilisiert.

#### 7.8. Nuklease $S_1$ -Verdauungen

Durch Einzelstrang-spezifische Nuklease  $S_1$  kann tRNA fragmentiert werden, wobei alle entstehenden Oligonukleotide eine 5'-Phosphatgruppe aufweisen (Harada und Dahlberg, 1975) und somit für Stanley-Vassilenko-Gele gebraucht werden können. Für die Verdauung wurde das Verfahren von

Harada und Dahlberg (1975) übernommen. Die Fragmente wurden auf einem 20% Polyacrylamid-8M Harnstoff-Gel aufgetrennt und wie in 6. beschrieben eluiert.

### III. RESULTATE

#### 1. Transfer RNA<sup>Phe</sup>

##### 1.1. Isolation mittels Affinitätschromatographie

Aus 100 A<sub>260</sub> unfraktionierter tRNA von *Drosophila melanogaster* wurden auf einer Affinitätssäule mit matrixgebundener tRNA<sup>Glu</sup> von *E. coli*

1,5 A<sub>260</sub> tRNA<sup>Phe</sup> isoliert (Abb. 1).

Diese tRNA entspricht dem zweiten Phenylalanin-Isoakzeptor (tRNA<sup>Phe</sup><sub>2</sub>) von White et al. (1973), kann aber mittels zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese in die Isoakzeptoren tRNA<sup>Phe</sup><sub>2a</sub> und tRNA<sup>Phe</sup><sub>2b</sub> aufgetrennt werden (Abb. 6), die je mit ca. 1400 pMolen Aminosäure pro A<sub>260</sub> tRNA beladen werden können und in etwa gleichen Mengen auftreten.

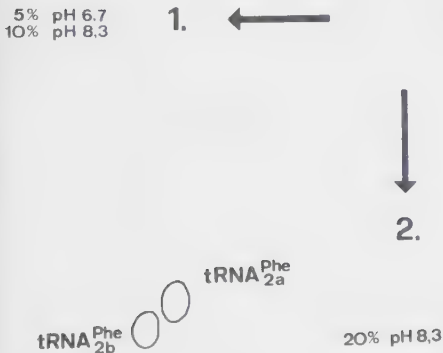


Abb. 6: Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese von tRNA<sup>Phe</sup><sub>2</sub>

##### 1.2. Isolation mittels RPC-5 - Chromatographie und zweidimensionaler Gelelektrophorese

Um die ziemlich arbeitsintensive und vor allem auch teure Herstellung von Affinitätssäulen zu umgehen, wurde total-tRNA von *Drosophila* mittels RPC-5 - Chromatographie in Puffer R-1 vorfraktioniert (Abb. 7). Für die Fraktionen A<sub>1</sub> bis H wurde die Akzeptoraktivität für Phenylalanin

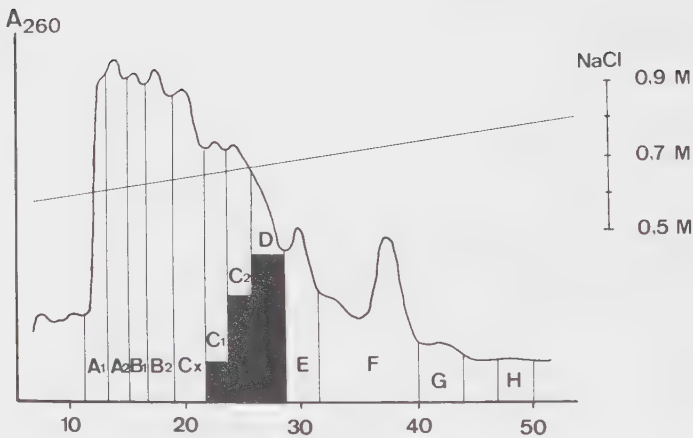
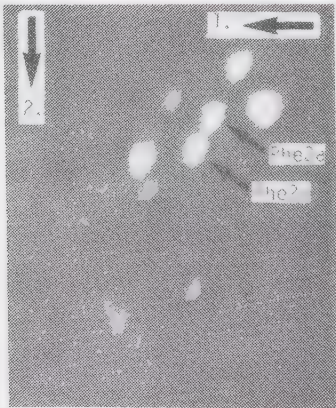


Abb. 7: RPC-5 - Chromatographie von total-tRNA mit Puffer R-1. Die tRNA der Fraktionen  $C_1$  bis D kann mit 52 ( $C_1$ ), 142 ( $C_2$ ) resp. 196 (D) pMolen Phenylalanin pro  $A_{260}$  tRNA beladen werden.



in pMol Aminosäure pro  $A_{260}$  tRNA bestimmt. Die  $tRNA^{Phe}$  enthaltenden Fraktionen  $C_1$ ,  $C_2$  und D wurden entweder gepoolt oder einzeln auf ein präparatives zweidimensionales Gel aufgetragen (Abb. 8 und 22). Schon rein optisch lässt sich aus Analogie zum Gel in Abb. 6 vermuten, welche Flecken den beiden Phe-Isoakzeptoren entsprechen. Dies konnte durch Aminoacylierung mit jeweils mehr als 1000 pMolen Phenylalanin pro  $A_{260}$  tRNA bestätigt werden.

Abb. 8: Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese vorfraktionierter tRNA (Fraktion D aus Abb. 7)

### 1.3. Nachweis von vier Isoakzeptoren

Cochromatographie von ( $^{14}\text{C}$ )-Phe-tRNA $_{2a}^{\text{Phe}}$  und ( $^3\text{H}$ )-Phe-tRNA $_{2b}^{\text{Phe}}$  auf RPC-5 bei pH 3,8 ergab für beide Isoakzeptoren eine Auftrennung in je zwei peaks (Abb. 9). Der zweite Phenylalanin-Isoakzeptor von White et al. (1973) ist also eigentlich aus vier verschiedenen Isoakzeptoren zusammengesetzt, die allerdings das gleiche Anticodon aufweisen (Affinitätschromatographie!) und sich auch sonst nur geringfügig unterscheiden dürfen (siehe auch unten).

### 1.4. Sequenzanalyse

Die Sequenzierungsarbeiten erfolgten jeweils parallel für tRNA $_{2a}^{\text{Phe}}$  und tRNA $_{2b}^{\text{Phe}}$ , wobei mit Ausnahme der angegebenen partiellen Modifikationen die Resultate identisch waren (für eine Uebersicht siehe Abb. 12).

Ein grosser Teil der tRNA $_{2a}^{\text{Phe}}$ -Sequenz konnte mit der Gelsequenzie-

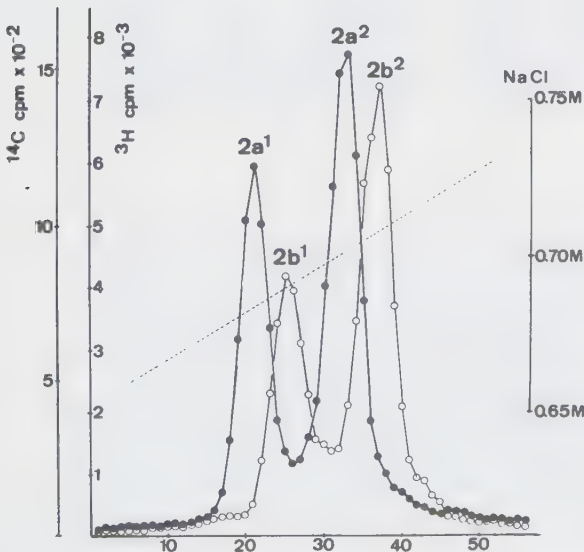


Abb. 9: RPC-5 - Chromatographie von ( $^{14}\text{C}$ )-Phe-tRNA $_{2a}^{\text{Phe}}$  (●—●) und ( $^3\text{H}$ )-Phe-tRNA $_{2b}^{\text{Phe}}$  (○—○) mit Puffer R-2

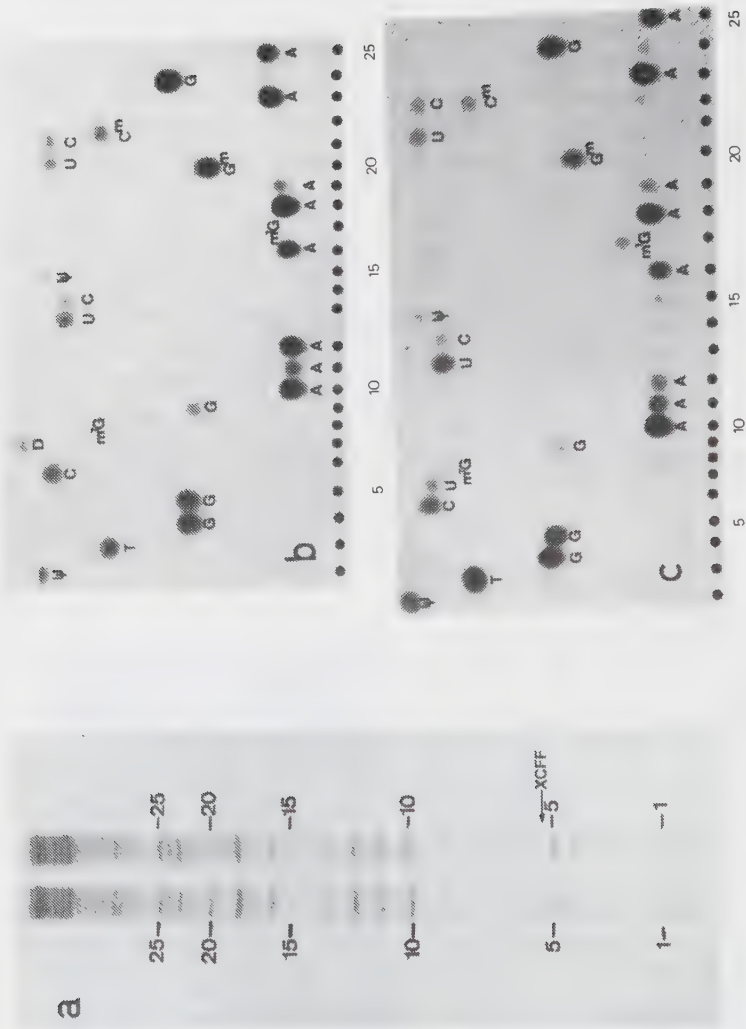


Abb. 10: Stanley-Vassilenko-Gel von tRNA<sup>Phe</sup><sub>2a</sub> und tRNA<sup>Phe</sup><sub>2b</sub> (a), sowie dünnsschichtchromatographische Bestimmung der 5'-terminalen Nukleotide einzelner Banden für tRNA<sup>Phe</sup><sub>2a</sub> (b) und tRNA<sup>Phe</sup><sub>2b</sub> (c)

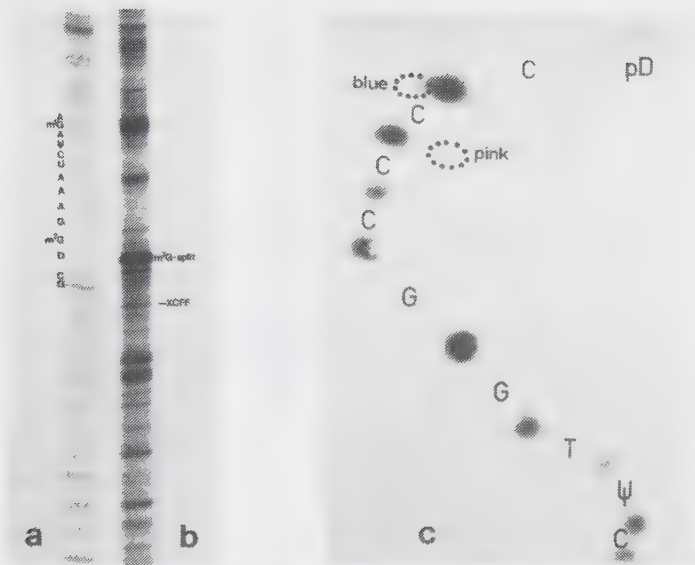


Abb. 11: (a) Stanley-Vassilenko-Gel, (b) Gelelektrophorese von  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{2a}$  nach spezifischer Spaltung bei  $\text{m}^7\text{G}$ , (c) zweidimensionale Homochromatographie von partiell verdauter RNA aus der  $\text{m}^7\text{G}$ -split-Bande von (b)

rungstechnik von Stanley and Vassilenko (1978) bestimmt werden. Dabei zeigt in verschiedenen Ansätzen je nach Dauer der Elektrophorese eine andere Region der tRNA eine optimale Auflösung. Ein repräsentatives Beispiel eines solchen Gels, zusammen mit der dünnschichtchromatographischen Analyse der 5'-terminalen Nukleotide zeigt Abb. 10. Zu diesen Resultaten ist folgendes festzuhalten:

- im Bereich des Extra-loops fehlen einige partielle Verdauungsprodukte, ohne dass dies auf dem Gel durch eine Lücke auffallen würde. Dies ist wahrscheinlich auf eine starke Sekundärstruktur zurückzuführen, die in diesem sehr GC-reichen Abschnitt vorkommen könnte
- auf der 3'-Seite von  $\text{m}^7\text{G}$  ist in  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{2a}$  ein D, in  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{2b}$  ein U zu finden
- bei beiden Isoakzeptoren taucht im Anticodonloop eine partielle Modifikation von C zu  $\text{C}^{\text{m}}$  auf

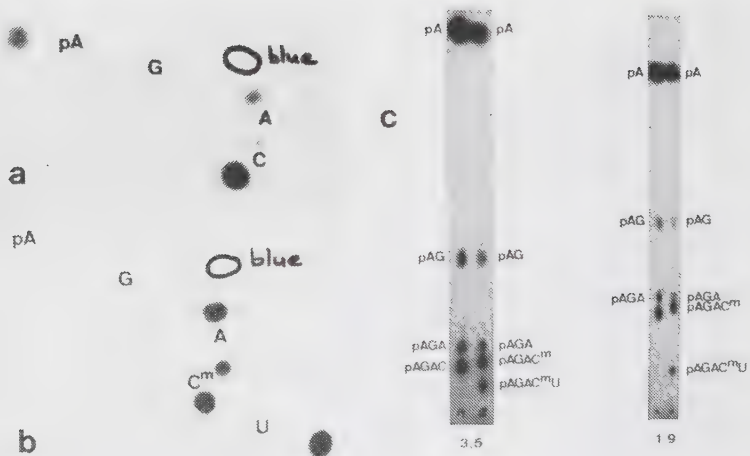


Abb. 12: Zweidimensionale Homochromatographie partieller Verdauungen von pAGAC (a) und pAGAC<sup>m</sup>U (b), sowie parallele Elektrophorese auf DEAE-Papier bei zwei verschiedenen pH-Werten (C)

- (d) einige Nukleotide am 3'- und am 5'-Ende konnten mit dieser Methode nicht bestimmt werden, da sie entweder zu klein (keine Präzipitation mehr möglich) oder zu gross (keine genügende Auflösung auf dem Gel) sind

Des weiteren wurden die Sequenzen von einigen RNase T<sub>1</sub>- respektive RNase A-Fragmenten bestimmt (für eine Uebersicht siehe Abb. 13). Eine nur partielle Verdauung durch RNase T<sub>1</sub> bei m<sup>1</sup>G führt zu überlappenden Fragmenten im Bereich des Anticodons. Bei den pankreatischen Verdauungen traten ebenfalls zwei sich überlappende Fragmente, AGAC und AGAC<sup>m</sup>U, auf (Abb. 12). Dies ist auf die Resistenz von 2-O-methylierten Nukleotiden gegenüber Ribonukleasen zurückzuführen und bestätigt, dass in Position 32 nur eine partielle Modifikation von C zu C<sup>m</sup> erfolgt ist.

Die Sequenz im Extra-loop wurde bestimmt durch spezifische Spaltung von tRNA<sup>Phe</sup><sub>2a</sub> bei m<sup>7</sup>G, Entfernung der 5'-Phosphatgruppe durch alkalische Phosphatase und anschliessende Markierung mit (<sup>32</sup>P)-γ-ATP, was die Sequenzierung des 3'-Fragmentes durch partielle Verdauung mit Nuklease P<sub>1</sub> und zweidimensionale Homochromatographie ermöglicht (Abb. 11).

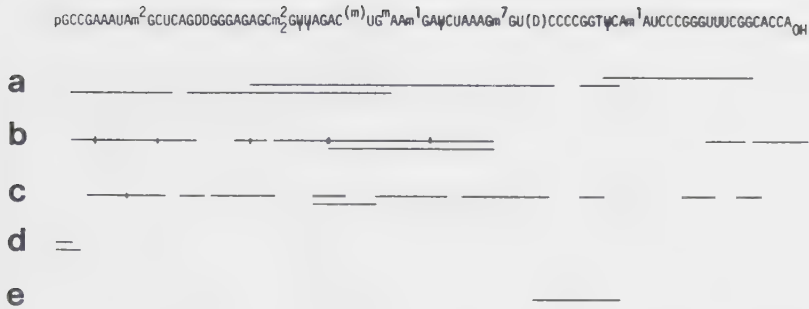


Abb. 13: Zusammenstellung von Sequenzierungsdaten von  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_2$ , die mit verschiedenen Methoden erhalten wurden: a Stanley-Vassilenko-Gele, b  $\text{T}_1$ -Fragmente, c RNase A-Fragmente, d uniform markiert, e  $\text{m}^7\text{G}$ -split

Das 5'-Ende war schon früher bestimmt worden durch Analyse von uniform markierter  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  (Altwegg, 1977). In einer  $\text{T}_1$ -Verdauung wurde das Fragment pGp, in einer pankreatischen Verdauung das Fragment pGpCp gefunden.

Die vollständige Sequenz von  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_2$  von *Drosophila melanogaster* mit ihren partiellen Modifikationen ist in Abb. 14 in der Kleeblattform dargestellt.

### 1.5. Veränderungen des Isoakzeptormusters während der Ontogenese

Für die Untersuchung der Veränderungen des Isoakzeptormusters von  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_2$  während der Entwicklung wurde das gleiche Chromatographiesystem

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Eier               | 14,0 % |
| Larven             | 50,3 % |
| 5-tägige Weibchen  | 55,3 % |
| 5-tägige Männchen  | 26,8 % |
| 35-tägige Weibchen | 63,2 % |
| 35-tägige Männchen | 40,1 % |

Tab. 3: Nicht- $\text{C}^m$ -haltige  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  in Prozenten der  $\text{C}^m$ -haltigen in verschiedenen Entwicklungsstadien (planimetrische Auswertung der Abb. 15 a bis e)

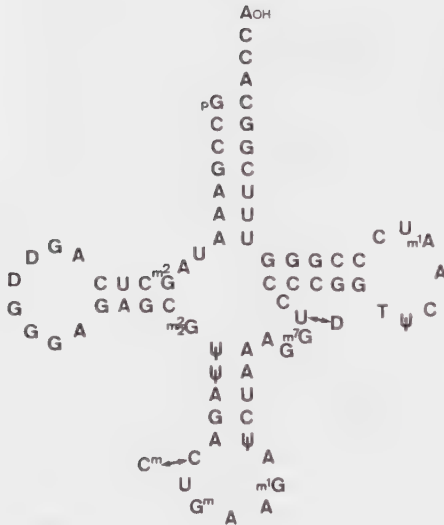


Abb. 14: Kleeblattstruktur von  $\text{tRNA}_{2}^{\text{Phe}}$  von *Drosophila melanogaster* mit den partiellen Modifikationen in den Positionen 32 und 47.

|                                  | 47 | 32             |
|----------------------------------|----|----------------|
| $\text{tRNA}_{2a1}^{\text{Phe}}$ | D  | C              |
| $\text{tRNA}_{2a2}^{\text{Phe}}$ | D  | C <sup>m</sup> |
| $\text{tRNA}_{2b1}^{\text{Phe}}$ | U  | C              |
| $\text{tRNA}_{2b2}^{\text{Phe}}$ | U  | C <sup>m</sup> |

(RPC-5 bei pH 3,8) angewendet wie in Abb. 9. Da es sich hier aber um Doppelmarkierungsexperimente mit unfractionierter tRNA handelt und sich deshalb die peaks  $2a^1$  und  $2b^1$  einerseits und  $2a^2$  und  $2b^2$  andererseits (Abb. 9) überlagern, ist ein Vergleich nur möglich zwischen C<sup>m</sup>-haltigen und nicht-C<sup>m</sup>-haltigen Isoakzeptoren (Abb. 15). Dazu wurde tRNA aus unbefruchteten Eiern, aus 5-tägigen Weibchen, 5-tägigen Männchen, 35-tägigen Weibchen und 35-tägigen Männchen jeweils mit ( $^{14}\text{C}$ )-Phe aminoacyliert und zusammen mit ( $^3\text{H}$ )-Phe-tRNA aus Larven als interne Kontrolle chromatographiert. Dabei zeigt sich, dass die Konzentration der C<sup>m</sup>-haltigen Isoakzeptoren immer größer ist. Der Gehalt an nicht methylierter tRNA ist allerdings starken Veränderungen unterworfen (Tab. 3).

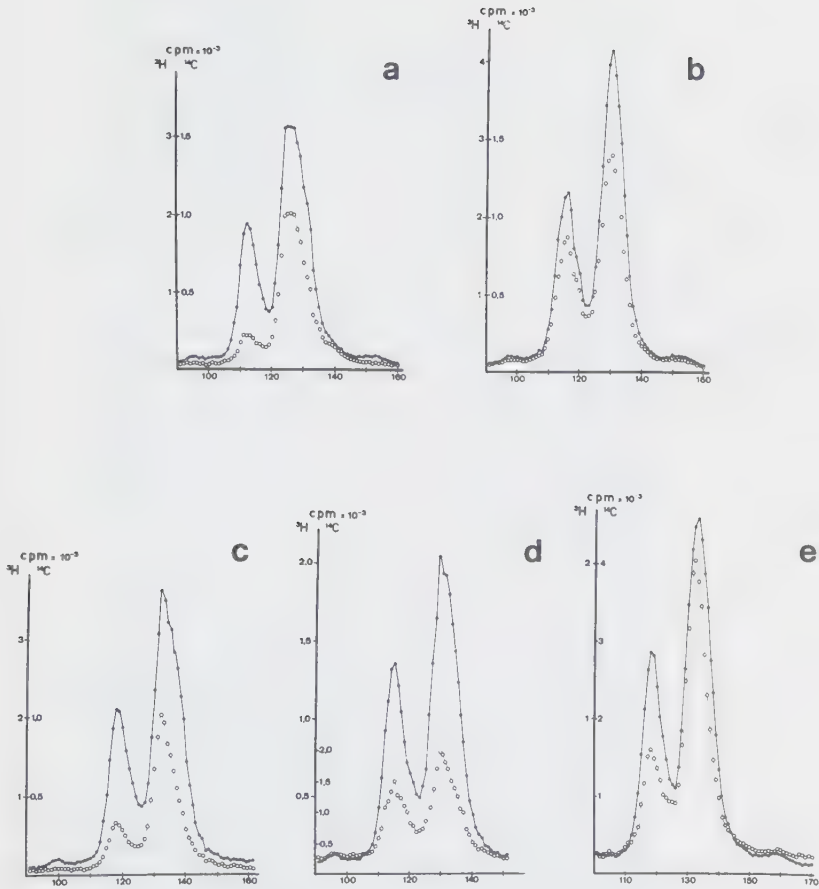
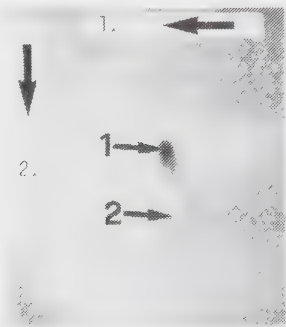


Abb. 15: RPC-5 - Chromatographie mit Puffer R-2 von ( $^3\text{H}$ )-Phe-tRNA aus Larven (●—●) mit ( $^{14}\text{C}$ )-Phe-tRNA (○—○) von Eiern (a), 5-tägigen Weibchen (b), 5-tägigen Männchen (c), 35-tägigen Weibchen (d) und 35-tägigen Männchen (e)

## 2. Transfer RNA<sup>Glu</sup>

### 2.1. Isolation

Transfer RNA<sup>Glu</sup> wurde aus unfractionierter tRNA mittels Affinitätschromatographie auf einer Säule mit matrixgebundener tRNA<sup>Phe</sup><sub>Hefe</sub> isoliert.



Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt, dass dieses Material fast homogen ist, erscheint doch neben einem grossen nur noch ein sehr kleiner Fleck (Abb. 16). Es handelt sich dabei einerseits um tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub> (Altwegg, 1977; Kubli and Schmidt, 1978) und um eine unbekannte tRNA-spezies, tRNA<sup>X</sup> (siehe unten), die jedoch nicht mit dem zweiten Flecken von Kubli and Schmidt (1978) identisch ist.

Abb. 16: Zweidimensionale Gelelektrophorese von tRNA isoliert auf einer tRNA<sup>Phe</sup><sub>Hefe</sub> enthaltenden Affinitätssäule

### 2.2. Sequenzierung

Einige Sequenzen von RNase T<sub>1</sub>- und RNase A-Fragmenten waren von Experimenten mit uniform markierter tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub> schon bekannt (Altwegg et al., 1978). Im weiteren wurde gleich vorgegangen wie für tRNA<sup>Phe</sup> (siehe vorn). Abb. 17 zeigt eine Zusammenstellung der sequenzierten Fragmente.

Von besonderem Interesse ist hier die Region des Anticodons, das in der Wobbleposition ein 2-thio-Uridin enthält (White, 1975). Aus ungeklärten Gründen ergab die partielle Verdauung mit Formamid oder Wasser keine regelmässige Verdauung für den Anticodonloop, sodass die vorhandenen Modifikationen nicht direkt mittels Stanley-Vassilenko-Gelen nachgewiesen werden konnten. Die Analyse beschränkte sich deshalb auf dasjenige RNase T<sub>1</sub>-Fragment, das die ganze Anticodon-Region umfasst. Das 5'-terminale Nukleotid ist eine Mischung aus C und C<sup>m</sup>, es scheint sich hier also um die gleiche partielle Modifikation in Position 32 zu handeln wie bei tRNA<sup>Phe</sup><sub>2</sub>. Die Sequenz dieses T<sub>1</sub>-Fragmentes wurde bestimmt durch zweidimensionale Homochromatographie von partiellen Verdauungen mit Nuklease P<sub>1</sub> (Abb. 18a)

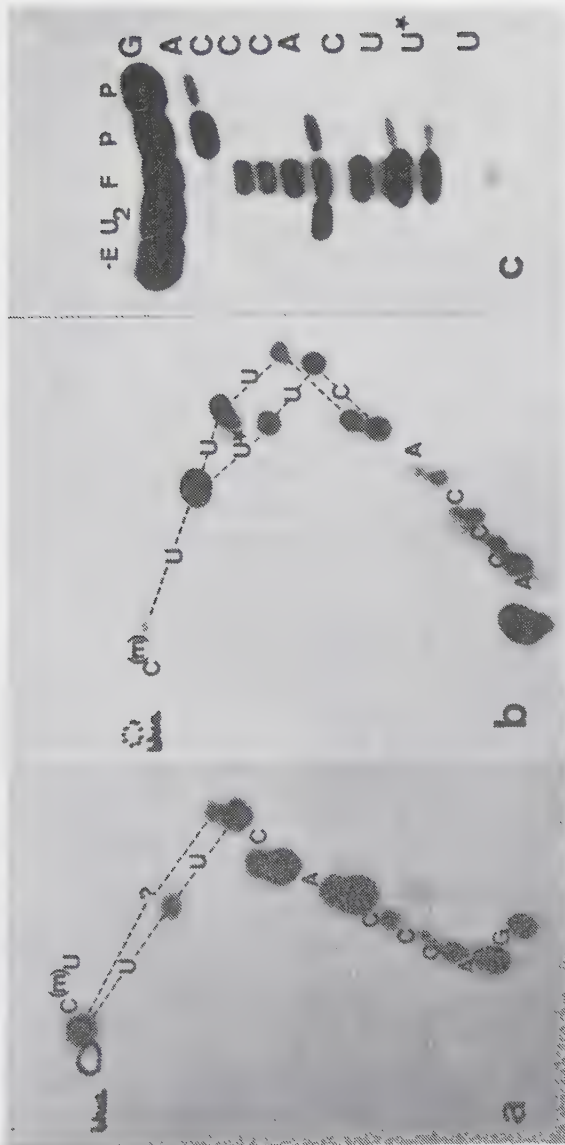


Abb. 18: Sequenz des RNase T<sub>1</sub>-Fragmentes im Bereich des Anticodons von tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub>. (a) und (b): Zweidimensionale Homochromatographie von partiellen Verdauungen mit Nuklease P<sub>1</sub> (a) und Formamid (b). (c): Sequenzierungsgel (-E = ohne Enzym; U<sub>2</sub> = RNase U<sub>2</sub>; F = Formamid-Leiter; P = RNase von Physarum, 0,5 resp. 0,05  $\mu$ l)

pUCCCAUAUGGUC $\psi$ AGDGGCDAGGAUAUCUGGC<sup>(m)</sup>UU\*UCACCCAGAAAGGCCGGGT $\psi$ CGAUUCCCGUAUGGGAACCA<sub>OH</sub>

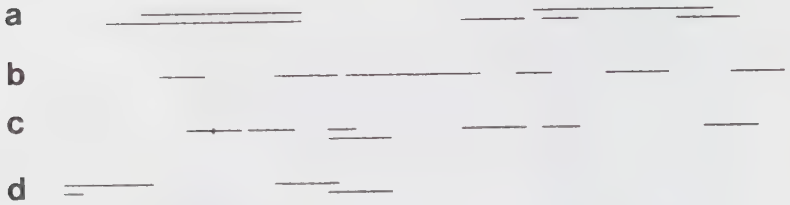


Abb. 17: Zusammenstellung von Sequenzierungsdaten von tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub>, die mit verschiedenen Methoden erhalten wurden: a Stanley-Vassilenko-Gele, b RNase T<sub>1</sub>-Fragmente, c RNase A-Fragmente, d uniform markiert

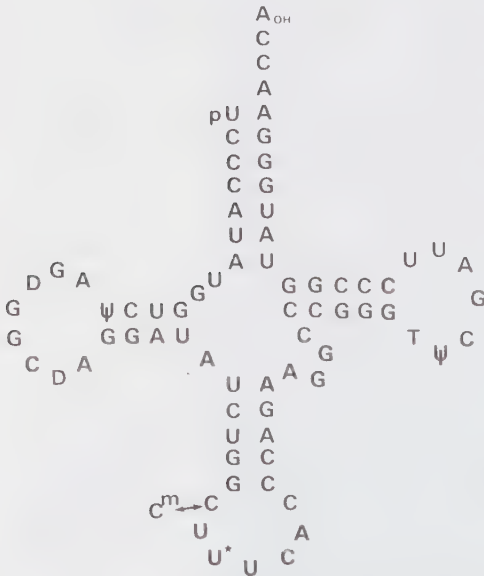


Abb. 19: Kleeblattstruktur von tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub> von *Drosophila melanogaster* mit der partiellen Modifikation in Position 32. U\*=2-thio-Uridin

oder Formamid (Abb. 18b) oder durch Gelelektrophorese von Verdauungen mit RNase U<sub>2</sub> respektive RNase von *Physarum* (Abb. 18c).

Die Doppelflecken bei den zweidimensionalen Auftrennungen sind eher darauf zurückzuführen, dass die Modifikation 2-thio-Uridin instabil ist (D. Söll, persönliche Mitteilung), als dass es sich um eine nur partielle Modifikation handelt. Die Unterschiede zwischen den Verdauungen mit Nuklease P<sub>1</sub> und Formamid beruhen einerseits auf dem Umstand, dass Nuklease P<sub>1</sub> Oligonukleotide mit einem 3'-Hydroxylende, Formamid hingegen mit einem 3'-Phosphatende produziert, und andererseits 2-thio-Uridin resistent ist gegenüber Nuklease P<sub>1</sub>.

Die vollständige Sequenz von tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub> mit ihrer partiellen Modifikation in Position 32 ist in Abb. 19 in Kleeblattform dargestellt.

Die unbekannte tRNA-spezies, die im zweidimensionalen Gel auftrat, ist vom 3'-Ende her partiell sequenziert worden. Die ersten 27 Nukleotide lauten:



Es könnte sich dabei um eine tRNA<sup>Lys</sup> handeln, die auf einer Affinitäts-säule ebenfalls retardiert werden kann (Grosjean et al., 1973). Transfer RNA<sup>Lys</sup><sub>2</sub> kommt jedoch nicht in Frage, da die Sequenzen nicht übereinstimmen (Silverman et al., 1979).

### 3. Isolation von tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Met</sup><sub>f</sub>, tRNA<sup>Arg</sup><sub>2</sub>, tRNA<sup>Gly</sup><sub>3</sub> und tRNA<sup>Ala</sup><sub>5</sub>

Mit der von Egg (1978) erstmals für *Drosophila* tRNA angewendeten zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese sind einige Hauptisoakzeptoren in einem Schritt aus unfractionierter tRNA isolierbar. Durch Aminoacy-

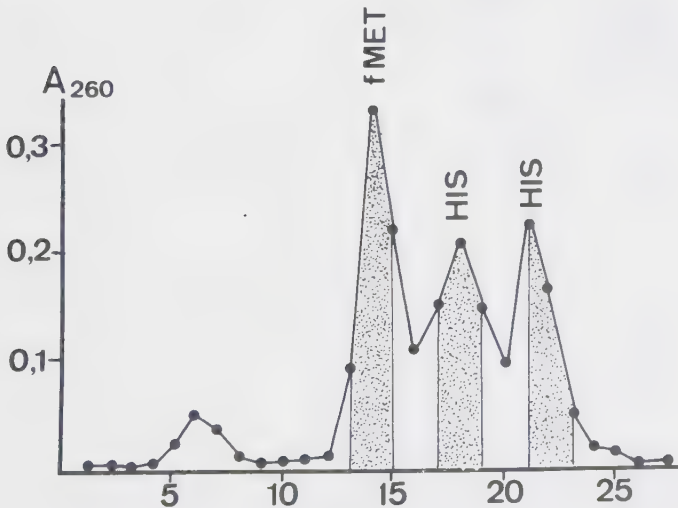


Abb. 20: Präparative RPC-5 - Chromatographie des tRNA<sup>His</sup> enthaltenden Gelfleckens aus Abb. 21 mit Puffer R-1 (NaCl-Gradient 0,5 - 0,8M)

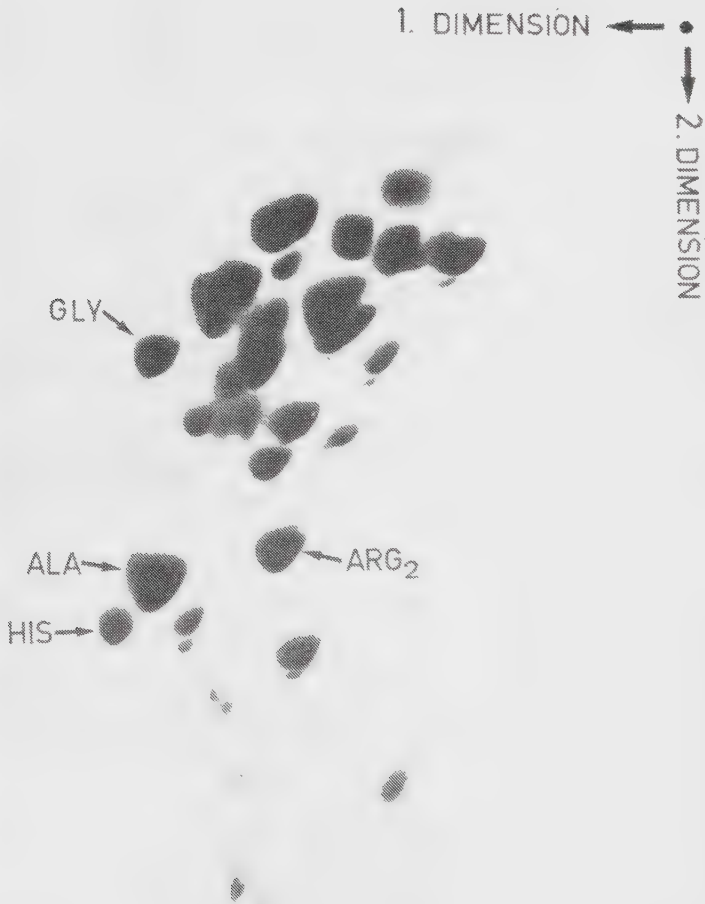


Abb. 21: Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese von unfraktionierter tRNA von *Drosophila melanogaster*

lierung sind von Dudler et al. (1980) einige Flecken bestimmt worden (Abb. 21), wobei für  $\text{tRNA}^{\text{Arg}}$  auch bekannt ist, dass es sich um den zweiten Isoakzeptor handelt. Bei Histidin sind beide Isoakzeptoren im gleichen Flecken vertreten. Da nicht bekannt war, ob diese Flecken nicht noch geringe Anteile anderer tRNA-Spezies enthielten und die zweidimensionale Auftrennung nicht immer eine so gute Auflösung aufwies wie in Abb. 21, erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt auf RPC-5 in Puffer R-1. Während  $\text{tRNA}^{\text{Gly}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Ala}}$  neben einem Hauptpeak einige nur sehr kleine peaks aufwies, ergab die Chromatographie von  $\text{tRNA}^{\text{His}}$  (Abb. 20), dass neben den beiden Histidin-Isoakzeptoren auch noch  $\text{tRNA}^{\text{Met}}$  vertreten war.

Keiner der weiter untersuchten Gelflecken war also völlig rein, wobei vor allem das Auftreten der  $\text{tRNA}^{\text{Met}}$  im Histidin-Flecken erstaunte. Wie die Sequenzanalyse zeigte (siehe hinten), handelt es sich dabei um die Initiator-tRNA. Schon Mazabraud and Garel (1979) fanden in dieser Region allerdings einen Flecken, der sich mit Methionin aminoacylieren liess.

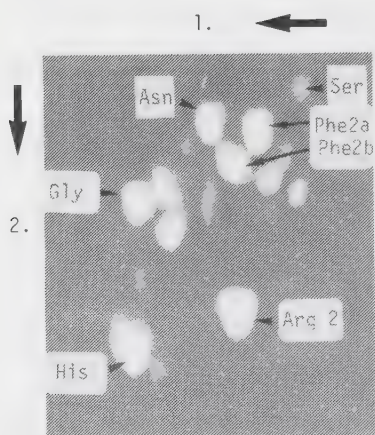
Bei  $\text{tRNA}^{\text{Ala}}$  erscheint ein zweiter peak bei einer Salzkonzentration von 1,5M, dessen Identität nicht bestimmt worden ist. Sowohl für diese tRNA wie auch für  $\text{tRNA}^{\text{Gly}}$  ist nicht gezeigt worden, um welche Isoakzeptoren es sich handelt. Die Salzkonzentration, bei der die tRNA's eluiert werden, und auch zweidimensionale Gelelektrophorese von vorfraktionierter tRNA (Züblin, 1980) lassen vermuten, dass es sich in beiden Fällen um die Hauptisoakzeptoren handelt, nämlich  $\text{tRNA}_3^{\text{Gly}}$  und  $\text{tRNA}_5^{\text{Ala}}$ .

#### 4. Isolation von $\text{tRNA}^{\text{Ser}}$ und $\text{tRNA}^{\text{Asn}}$

Für die Isolation praktisch jeder beliebigen tRNA bietet sich folgendes Vorgehen an:

- (a) Vorfraktionierung der tRNA auf Sepharose 4B (Holmes et al., 1975) oder RPC-5 (Pearson et al., 1971)
- (b) zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Fraktionen, die unter anderem die gewünschte tRNA enthalten
- (c) in einer beschränkten Anzahl Flecken muss dann mittels Aminoacylierung die betreffende tRNA gesucht werden

Mit diesem Ansatz konnten neben  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  (siehe vorn) auch noch  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}$



und  $\text{tRNA}^{\text{Asn}}$  gereinigt werden. RPC-5 - Fraktionen  $C_1$ ,  $C_2$  und D (Abb. 7), die unter anderem diese beiden tRNA's enthalten (Züblin, 1980), wurden gepoolt und jeweils etwa 6  $A_{260}$ -Einheiten pro Gel aufgetragen (Abb. 22). Durch Aminoacylierung wurde die Identität verschiedener Flecken bestimmt. Bei  $\text{tRNA}^{\text{His}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Gly}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Arg}}$  handelt es sich um die schon beschriebenen Spezies, für  $\text{tRNA}^{\text{Asn}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}$  ist nicht bestimmt worden, um welchen Isoakzeptor es sich handelt.

Abb. 22: Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese von gepoolten RPC-5 - Fraktionen  $C_1$  bis D

### 5. Sequenzierung von $\text{tRNA}^{\text{His}}$

Untersuchungen von White et al. (1973b) lassen vermuten, dass sich die beiden Histidin-Isoakzeptoren nur durch die Anwesenheit der Q-Base bei  $\text{tRNA}^{\text{His}}$  in der ersten Position des Anticodons unterscheiden. Die Sequenzanalyse beschränkte sich denn auch grösstenteils auf den zweiten Isoakzeptor, der keine Q-Base enthält. Einige Experimente sind jedoch für beide Formen durchgeführt worden, ohne dass sich Unterschiede ergeben hätten. Es darf allerdings nicht als direkt bewiesen angenommen werden, dass die oben gemachte Annahme richtig ist.

Die Sequenz am 3'- respektive am 5'-Ende von  $\text{tRNA}^{\text{His}}$  wurde bestimmt durch Endmarkierung der tRNA, partielle Verdauung in deionisiertem Formamid und anschliessende zweidimensionale Homochromatographie (Abb. 23). Der grösste Teil der Sequenz wurde mit der Gelsequenzierungstechnik von Stanley and Vassilenko (1978) bestimmt. Für die Region des Anticodon- und des Extra-loops ergaben sich Schwierigkeiten, da einige Lücken auftraten, die aber nicht durch besonders grosse Abstände zwischen einzelnen Banden aufgefallen wären (Abb. 24). Eine Möglichkeit, diese Lücken zu schliessen, besteht in der weiteren Analyse einzelner Banden. Zusätzlich zur 5'End-Be-

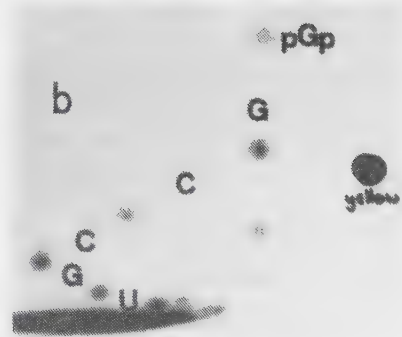
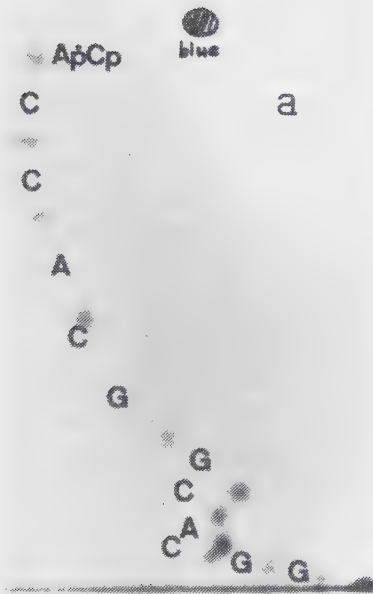


Abb. 23: Zweidimensionale Homochromatographie von partiell verdauter tRNA<sup>His</sup> mit Markierung am 3'- (a) respektive am 5'-Ende (b)

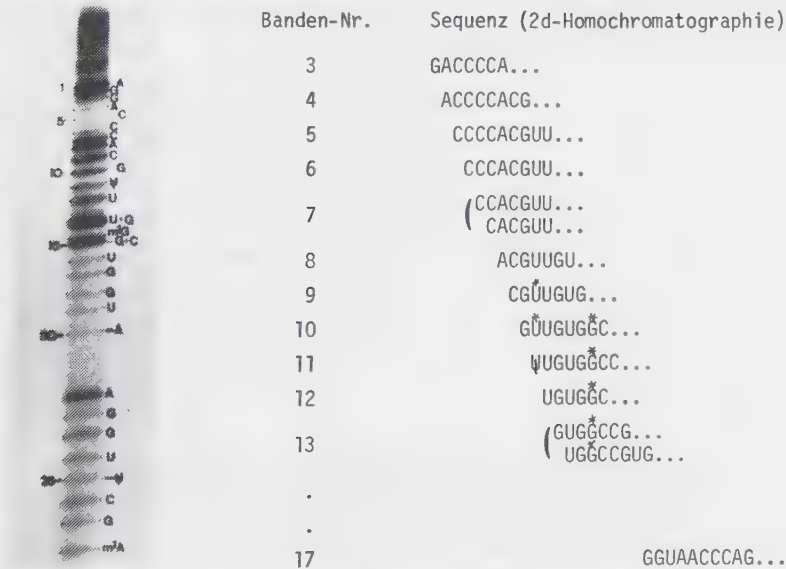


Abb. 24: Stanley-Vassilenko-Gel von tRNA<sup>His</sup>: Sequenz der Anticodonregion



7. Partielle Sequenzen von tRNA<sup>Arg</sup><sub>2</sub>, tRNA<sup>Gly</sup><sub>3</sub>, tRNA<sup>Val</sup><sub>3b</sub>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> und tRNA<sup>Asp</sup>

Partielle Sequenzen von sechs weiteren tRNA's wurden ebenfalls bestimmt durch zweidimensionale Homochromatographie von 3'-End-markierter tRNA sowie mittels Stanley-Vassilenko-Gelen. Die Resultate für tRNA<sup>Arg</sup><sub>2</sub>, tRNA<sup>Gly</sup><sub>3</sub>, tRNA<sup>Val</sup><sub>3b</sub> und tRNA<sup>Asn</sup>, die nicht weiter dokumentiert werden, sind in Abb. 28 zusammengefasst.

Für tRNA<sup>Ser</sup> und tRNA<sup>Asp</sup> sind nur einige Nukleotide vom 3'-Ende her ermittelt worden:

tRNA<sup>Ser</sup> ...UCCUCGUCGCCA<sub>OH</sub>

tRNA<sup>Asp</sup> ...C<sub>G</sub>GGGAGCCA<sub>OH</sub>

Für die tRNA<sup>Gly</sup><sub>3</sub> wurde ein neuer Ansatz versucht. Nuklease S<sub>1</sub> verdaut nur einzelsträngige Nukleinsäuren, bei tRNA wird vorwiegend im exponierten

Anticodon-loop geschnitten. Dabei entstehen an der Schnittstelle eine 3'-OH- und eine 5'-Phosphatgruppe (Harada and Dahlberg, 1975). Die Fragmente wurden dann auf einem 20% Polyacrylamid-8M Harnstoff-Gel aufgetrennt (Abb. 27), wobei die Banden 5 bis 7 den 3'-Hälften, die Banden 8 bis 10 den 5'-Hälften der tRNA entsprechen dürften. Dies konnte bekräftigt werden durch Sequenzierung von Bande 8 mittels Stanley -Vassilenko-Gel (nicht gezeigt). Diese Methode der Fragmentierung einer tRNA mit Nuklease S<sub>1</sub> kann also die Sequenzierung von tRNA's im Bereich ihrer 5'-Enden bedeutend erleichtern.



Abb. 27: Polyacrylamid-Gelelektrophorese einer Nuklease S<sub>1</sub>-Verdauung von tRNA<sup>Gly</sup><sub>3</sub>



## IV. DISKUSSION

### 1. Isolation von tRNA's

Im Verlaufe dieser Arbeit sind zwei grundlegend verschiedene Wege beschrieben worden, um spezifische tRNA's rein darzustellen. Affinitätschromatographie (in Verbindung mit ein- oder zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese) kam für die Isolation von tRNA<sup>Glu</sup> und tRNA<sup>Phe</sup> zur Anwendung. Die Herstellung des Säulenmaterials ist ziemlich aufwendig und teuer, diese Methode bietet jedoch ganz entscheidende Vorteile:

- (a) in einem Schritt können aus unfractionierter tRNA ganz spezifisch bestimmte Isoakzeptoren isoliert werden (Grosjean et al., 1973; Altmegg et al., 1978)
- (b) sie ermöglicht die Isolation von Vorläufern, sofern diese die entsprechende Anticodonkonformation bereits aufweisen (Vögeli et al., 1975)

Eine weitere Möglichkeit zur affinitätschromatographischen Isolation bieten die zuckerhaltigen Q\*-Basen-tRNA's. Transfer RNA<sup>Asp</sup> von Säugern, die in der ersten Position des Anticodons die Base Q\* enthält, kann durch Chromatographie an Concanavalin A-Sepharose (Affinität für Mannose) gewonnen werden (Okada et al., 1977). Dieselbe Methode ist auch für die Isolation von tRNA<sup>Asp</sup><sub>2d</sub> von *Drosophila melanogaster* verwendet worden (Egg, 1978; Schmidt et al., 1978). Sofern die modifizierte Q-Base schon auf der Stufe der tRNA-Vorläufer zu finden wäre, könnten diese auf einfache Art und Weise ebenfalls isoliert werden (Stewart et al., 1976). Problematisch dabei bleibt jedoch die genügend starke Markierung der sehr kurzlebigen Vorläufermoleküle (Matouschek, 1979).

Reine tRNA's können aber noch auf ganz anderem Weg gewonnen werden. Mittels zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Egg, 1978) kann tRNA von *Drosophila melanogaster* in 50 bis 70 verschiedene Flecken aufgetrennt werden. Einige prominente Flecken wurden ausgeschnitten, eluiert und auf RPC-5 chromatographiert (Abb. 20). So konnten recht grosse Mengen von tRNA<sup>Gly</sup><sub>3</sub>, tRNA<sup>Arg</sup><sub>2</sub>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>His</sup><sub>1d</sub>, tRNA<sup>His</sup><sub>1g</sub> und tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub> ge-

reinigt werden. Die umgekehrte Reihenfolge erlaubt die Isolation von  $\text{tRNA}_{2a}^{\text{Phe}}$ ,  $\text{tRNA}_{2b}^{\text{Phe}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Asn}}$ , die auf zweidimensionalen Gelen unfraktionierter tRNA nicht als einzelne, reine Flecken erkennbar sind.

Vorfraktionierung auf RPC-5 (Züblin, 1980) oder Sepharose 4B (Holmes et al., 1975; Schmidt et al., 1978) und zweidimensionale Gelelektrophorese erleichterten die Identifikation enorm. Durch Kombination von Säulenchromatographie und Gelelektrophorese dürfte praktisch jede beliebige tRNA mit nicht allzu grossem Aufwand isoliert werden können. Selbst kleinere Verunreinigungen können jedoch (vor allem bei Hybridisierungsexperimenten) zu falschen Resultaten führen. Folgende Beobachtungen zeigen aber, dass die in der vorliegenden Arbeit isolierten tRNA's sehr rein sind:

- (a) Aminoacylierungsexperimente zeigen eine Beladung von 1000-1400 pMole Aminosäure pro  $A_{260}$ -Einheit isolierte, reine tRNA. Dies ist zwar etwas weniger als der theoretische Wert von 1600pMol/ $A_{260}$ ; wegen der Instabilität der Synthetasen werden bei *Drosophila* jedoch nie maximale Beladungswerte erreicht (Olexa, 1977)
- (b) während der Sequenzierung sind nie auf Verunreinigungen zurückzuführende Störungen aufgetreten (z.B. Fingerprints)
- (c) "in situ"-Hybridisierungen von tRNA's stimmen überein mit denjenigen von entsprechenden Plasmiden (Kubli and Schmidt, 1978; Hosbach et al., 1980)

## 2. Sequenzierungsmethodik

Die von Silberklang et al. (1979) entwickelten Methoden zur Sequenzierung nicht-radioaktiver tRNA sind vor allem für die Strukturaufklärung von eukaryontischen tRNA's sehr wertvoll, erlauben sie doch eine Umgehung der nicht sehr effizienten in vivo-Markierung mit ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphat (Altwegg et al., 1978; Matouschek, 1979). Eine weitere Erleichterung stellt die Gelsequenzierungstechnik von Stanley and Vassilenko (1978) dar, mit der in dieser Arbeit grosse Teile der tRNA's sequenziert werden konnten. Ganz unproblematisch wird dadurch jedoch eine Sequenzanalyse nicht, können doch etliche Komplikationen auftreten.

Die Methode von Silberklang et al. (1979) beruht hauptsächlich auf der zweidimensionalen Homochromatographie partieller Verdauungen von RNase  $T_1$ - oder RNase A-Fragmenten, wobei sehr charakteristische "angular jumps"

(Abb. 5) der vier Nukleotide A,G,C und U einen Rückschluss auf die Sequenz erlauben. Bei sehr langen Fragmenten treten jedoch Interpretationsschwierigkeiten auf, da die Auflösung mangelhaft wird. Durch Verdauung dieser Fragmente mit spezifischen Nukleasen und anschliessender Gelelektrophorese (Abb. 18) konnten die Sequenzen aber eindeutig ermittelt werden. Eine direkte Identifikation von modifizierten Nukleotiden durch zweidimensionale Homochromatographie ist nur möglich, wenn diese entweder am 5'-Ende der Fragmente vorkommen, oder wenn, wie im Falle von  $m^1A$  oder  $m^7G$ , eine Identifikation anhand der veränderten Mobilitäten im zweidimensionalen System möglich ist. Einige Hinweise kann auch die Elektrophorese auf DEAE-Papier bei zwei verschiedenen pH-Werten ergeben (Abb.11). Die ziemlich geringe Reproduzierbarkeit der M-Werte erfordert jedoch meistens ein Markerfragment mit bekannter Sequenz, um eine eindeutige Zuordnung machen zu können.

Die direkte Identifikation von Modifikationen und die Einordnung von Fragmenten ermöglicht die Gelsequenzierungstechnik von Stanley and Vassilenko (1978). Die Schwierigkeiten dieser Methode liegen in der sehr starken Sekundär- und Tertiärstruktur von tRNA-Molekülen. Diese dürften zwar während der partiellen Verdauung ( $100^{\circ}C$ , in Formamid oder Wasser) aufgeschmolzen werden, während der Kinasierungsreaktion unter nicht denaturierenden Bedingungen (wässrige Lösung ohne Harnstoff,  $37^{\circ}C$ ) und auch während der Gelelektrophorese können sie einige Unregelmässigkeiten verursachen, teilweise ohne dass dies im Bandenmuster auffallen würde (Anticodonregion von  $tRNA^{His}$  und  $tRNA^{Glu}$ , Extraloop von  $tRNA^{Phe}$  usw., vgl. Abb. 10, 17 und 24). Diesem Ansatz sind auch Grenzen gesetzt durch das beschränkte Auflösungsvermögen der Gele im Bereich der grossen Fragmente (grösser als 60 Nukleotide). Durch Verdauung der tRNA mit Nuklease  $S_1$  (vorwiegend im Anticodon) war es möglich,  $tRNA^{Gly}_3$  so zu fragmentieren, dass die 5'-Hälfte ohne grosse Probleme fast bis ans 5'-Ende hinaufsequenziert werden konnte. Die im Originalansatz vorgeschlagene Elution der endmarkierten partiellen Fragmente und deren anschliessende Ausfällung mit Aethanol setzt auch im Bereich des 3'-Endes Grenzen, sind doch allzu kleine Oligonukleotide kaum fällbar, auch nicht in Anwesenheit von Träger-RNA. Durch zweidimensionale Homochromatographie von partiell verdauter, 3'-End-markierter tRNA konnte diese Lücke geschlossen werden. Alternativen dazu wurden von Gupta et al. (1979) und Tanaka et al. (1980) vor-

geschlagen. Durch "Kontakt-Transfer" auf DEAE- oder PEI-Dünnschichtplatten gehen diese Fragmente nicht mehr verloren und können zusammen mit allen anderen analysiert werden. In dieser Arbeit ist diese Methode jedoch nicht angewendet worden.

Eine wesentliche Vereinfachung konnte für die partielle Verdauung endmarkierter RNA verwirklicht werden. An Stelle der ziemlich heiklen enzymatischen Verdauungen trat eine partielle Verdauung bei 100°C in Formamid oder Wasser. Das Prozedere wird dadurch viel einfacher und die partiellen Verdauungsprodukte sind erst noch viel gleichmässiger vertreten, da Modifikationen kaum mehr stören.

### 3. Transfer RNA<sup>Phe</sup>

Unter Standardbedingungen lässt sich tRNA<sup>Phe</sup> von *Drosophila* auf RPC-5 in drei Isoakzeptoren auftrennen, von denen zwei einen verschwindend kleinen Anteil ausmachen (White et al., 1973). Diese werden im folgenden nicht mehr berücksichtigt, obwohl sie natürlich, sofern sie sich nicht als Artefakt erweisen, durchaus eine wichtige Funktion haben könnten.

Die mittels Affinitätschromatographie isolierte tRNA<sup>Phe</sup> entspricht dem zweiten Isoakzeptor (Hauptisoakzeptor). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich dabei eigentlich um vier distinkte Isoakzeptoren handelt, die sich im Ausmass ihrer Modifikationen in den Positionen 32 (C-C<sup>m</sup>) und 47 (U-D) unterscheiden (Abb. 14). Die für diese Versuche benutzte tRNA von 5 bis 15 Tagen alten Fliegen wies diese partiellen Modifikationen in etwa 25% (für C<sup>m</sup>) resp. 50% (für D) aller tRNA<sup>Phe</sup>-Moleküle auf, wobei sich diese Zahlen aber je nach Alter und Geschlecht ziemlich stark ändern (siehe unten).

Ähnliche Befunde sind inzwischen auch von Keith and Dirheimer (1980) für tRNA<sup>Phe</sup> der hinteren Seidendrüse von *Bombyx mori* publiziert worden. Die Sequenzen in diesen beiden Insektenarten sind beinahe identisch:

| Nukleotid | <i>Bombyx</i>      | <i>Drosophila</i> |
|-----------|--------------------|-------------------|
| 51        | C                  | U                 |
| 57        | G (80%)<br>A (20%) | A                 |

Auch die für *Drosophila* gefundenen partiellen Modifikationen sind bei *Bombyx mori* vorhanden, jedoch sind nur 5-10% der Moleküle nicht modifiziert. Ob sich das Verhältnis der entsprechenden Isoakzeptoren während der Entwicklung ähnlich wie bei *Drosophila* verschiebt und ob diese Untermodifikationen beide sich in Position 57 unterscheidenden Isoakzeptoren betreffen, lässt sich nicht sagen, denn es gelang den Autoren nicht, die Isoakzeptoren säulenchromatographisch aufzutrennen.

Die bei Eukaryonten übliche Y-Base auf der 3'-Seite des Anticodons von tRNA<sup>Phe</sup> ist sowohl bei *Drosophila* als auch bei *Bombyx mori* ersetzt durch m<sup>1</sup>G. Diese beiden tRNA's sind diesbezüglich der tRNA<sup>Phe</sup> von *Mycoplasma* und Hefe-Mitochondrien vergleichbar. Sowohl ein Vergleich der gesamten Sequenzen als auch Aminoacylierungsversuche (White and Tener, 1973) zeigen jedoch deutlich die nähere Verwandtschaft mit den übrigen Eukaryonten an. Inzwischen ist auch für Oocyten von *Tinca tinca* (Teleostier) nachgewiesen worden, dass die Y-Base fehlt (Mazabraud, 1979).

Durch Injektionsversuche in *Xenopus*-Oocyten konnte nachgewiesen werden, dass beide Isoakzeptoren, die sich in der Modifikation im Extraloop unterscheiden, in der Proteinsynthese gebraucht werden (nicht gezeigt). Trotzdem kann in *Drosophila* die nur partielle Modifikation einen Effekt zeigen, ist doch bei den Injektionsexperimenten ein heterologes System gebraucht worden. Auch ist nicht untersucht worden, ob beide tRNA's mit der gleichen Effizienz an der Proteinsynthese teilnehmen. Für *Dictyostelium discoideum* ist z.Bsp. gezeigt worden, dass tRNA's ohne Ribothymidin im TΨC-loop im Cytoplasma akkumuliert werden, während die modifizierten Moleküle häufiger auf den Polysomen anzutreffen sind (Männlein et al., 1980). Untermodifikationen können die Translation offenbar zumindest quantitativ beeinflussen.

#### 4. Transfer RNA<sup>Glu</sup>

Transfer RNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub> besitzt in der ersten Position des Anticodons (Wobble-Position) ein s<sup>2</sup>U. Diese Modifikation bewirkt, dass die tRNA die Fähigkeit verliert, beide Glutaminsäurecodonen (GAA und GAG) lesen zu können, weil s<sup>2</sup>U mit G nicht mehr paaren kann (Madison and Boguslawski, 1974; Kobayashi et al., 1974). Mindestens ein weiterer Isoakzeptor ist also nötig.

Durch "in situ"-Hybridisierungen an Speicheldrüsenchromosomen sind drei Loci für tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub> gefunden worden (Kubli and Schmidt, 1978). Der Locus 52F ist von Kubli (1978) in einen Zusammenhang mit der Letalmutante 1(2)me gestellt worden, bei der das tRNA<sup>Glu</sup>-Isoakzeptormuster verändert ist. Bei 56EF hybridisieren sowohl 5sRNA als auch tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub>. Restriktionsanalysen zeigen jedoch, dass die beiden (redundanten) Sequenzen nicht abwechselungsweise vorkommen, sondern in voneinander getrennten Einheiten (Schmidt, 1980). Der dritte Locus bei 62A ist von besonderem Interesse, haben doch Hosbach et al. (1980) Plasmiden isoliert, die ebenfalls hier hybridisieren. Fünf tRNA<sup>Glu</sup>-Gene sind auf den überlappenden Plasmiden TR13, TR113 und TR213 gefunden worden. Vier davon sind identisch, eines zeigt eine einzige Nukleotidänderung im Akzeptorstamm. Sie unterscheiden sich jedoch in 6 (resp. 7) Nukleotiden von tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub>. Ihr Anticodon ist CUC, sie vermögen also das Glu-Codon GAG zu lesen. Da das Screening der Plasmidenbank mit tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub> erfolgte, muss eine Kreuzhybridisierung stattgefunden haben. Es stellt sich also die Frage, ob ausserhalb der von den drei Plasmiden umfassten 12'500 Basenpaaren tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub>-Gene vorhanden sind, oder ob die Markierung bei 62A auf Kreuzhybridisierungen zurückzuführen ist. Erst weitere Untersuchungen können Aufschluss darüber geben, ob die sequenzierten Gene überhaupt, und wenn ja wann, transkribiert werden. Es ist auch ungeklärt, für welche der drei übrigen Isoakzeptoren von White et al. (1973) sie codieren würden.

#### 5. Transfer RNA<sup>His</sup>

Die beiden Histidin-Isoakzeptoren bei Drosophila zeigen während Entwicklung und Alterung zu den anderen Q-Basen-haltigen tRNA's parallele Veränderungen (White et al., 1973; Hosbach and Kubli, 1979). Untersu-

chungen von White et al. (1973b) lassen vermuten, dass es sich um tRNA's mit der gleichen Sequenz handelt, die sich nur in der Base Q an der ersten Stelle des Anticodons (Wobble-Position) unterscheiden. Aus diesem Grund ist nur tRNA<sup>His</sup> sequenziert worden. Partielle Sequenzierungsdaten von tRNA<sup>His</sup> zeigen jedoch keine Unterschiede. Es scheint sich wirklich um sequenzgleiche tRNA's zu handeln, obwohl eine definitive Aussage erst durch vollständige Sequenzierung auch des zweiten Isoakzeptors gemacht werden kann.

Bei der hier bestimmten Sequenz von tRNA<sup>His</sup> handelt es sich um die erste derartige Sequenz eines höheren Eukaryonten. Sie kann also nur mit der entsprechenden tRNA von E.coli und Hefe-Mitochondrien verglichen werden (Sprinzl et al., 1980). Sie teilt mit diesen die sonst bei keiner tRNA gefundene Eigenschaft eines zusätzlichen Nukleotids (G) am 5'-Ende, wobei dieses bei Drosophila nicht mit dem vierten Nukleotid vom 3'-Ende her (Diskriminatorbase) paaren kann, da hier ein A anstelle des prokaryontischen C gefunden wird. Solche Änderungen in der Diskriminatorbase zwischen Pro- und Eukaryonten sind nicht selten, treten sie doch auch bei tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Lys</sup> und tRNA<sup>Arg</sup> auf (Sprinzl et al., 1980), wobei in diesen Fällen allerdings keine Basenpaarung gestört wird. Ueber die Funktion eines zusätzlichen Nukleotids am 5'-Ende ist nichts bekannt.

Schon mehrfach gefunden wurde jedoch das Phänomen, dass anstelle der sonst üblichen Sequenz TΨC die Sequenz UUC vorhanden ist. Da dieser Abschnitt der tRNA für die Interaktion mit dem Ribosom verantwortlich ist, stellt sich die Frage, ob solche tRNA's in der Proteinsynthese ihre Aufgabe mit der gleichen Effizienz erfüllen können (Kersten, 1980).

## 6. Transfer RNA<sup>Met</sup><sub>i</sub>

Die Sequenz der Initiator-tRNA von *Drosophila melanogaster* (Stamm Samarkand) ist von Silverman et al. (1979) beschrieben worden. Sie passt genau in das für andere eukaryontische Initiator-tRNA's beobachtete Muster, insbesondere die AUCG-Sequenz für die Interaktion mit dem Peptidyl-site des Ribosoms. Die hier gefundene Sequenz (Stamm Oregon) stimmt mit obiger mit Ausnahme einer zusätzlichen Methylierung (m<sup>5</sup>C in Position 49) überein.

## 7. Modifikation und Alterung

Im Verlaufe dieser Arbeit sind verschiedentlich nur partielle Modifikationen von bestimmten Nukleotiden gefunden worden. Es handelt sich dabei um die auch bei *Bombyx mori* gefundenen in Position 32 ( $C^m$ ) und Position 47 (D) von  $tRNA^{Phe}$ , sowie um eine identische partielle Methylierung von  $tRNA^{Glu}_4$ . Eine ähnliche Heterogenität ist in  $tRNA^{Lys}_2$  (Silverman et al., 1979) vielleicht nur deshalb nicht gefunden worden, weil die benutzten Methoden eine solche Identifikation zumindest sehr erschweren.

Durch Aminoacylierung von tRNA aus verschiedenen Stadien und Chromatographie auf RPC-5 bei pH 3,8 wurde untersucht, wie sich die Anteile der verschiedenen Phe-Isoakzeptoren während der Entwicklung verändern (Abb. 15 a-e; Tab. 3). Da unfractionierte tRNA untersucht wurde, konnte nur das Ausmass der Methylierung in Position 32 verfolgt werden. Die beobachteten Veränderungen des Isoakzeptormusters können durch zwei sich überlagernde Einflüsse erklärt werden:

- (a) in sehr aktiven Stadien (Larven mit ausgeprägtem Wachstum, 5-tägige Weibchen mit grosser Eilegeaktivität), in denen auch eine entsprechend grosse tRNA-Synthese feststellbar sein dürfte, ist ein grosser Teil der tRNA nicht methyliert. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Methylase in zu geringen Mengen vorhanden ist, um die neu synthetisierte tRNA sofort modifizieren zu können
- (b) mit zunehmendem Alter nimmt die Konzentration oder Aktivität der Methylasen ab, was sich in einem grösseren Anteil untermethylierter  $tRNA^{Phe}$  bei alten Tieren ausdrückt.

Veränderungen des Isoakzeptorenusters bei *Drosophila* im Verlaufe von Entwicklung und Alterung sind vor allem bei den Q-Basen-haltigen tRNA's ( $tRNA^{Asp}$ ,  $tRNA^{Asn}$ ,  $tRNA^{Tyr}$  und  $tRNA^{His}$ ) festgestellt worden (White et al., 1973; Hosbach and Kubli, 1979). Dort ist allerdings genau der umgekehrte Trend festzustellen, indem das Ausmass der Modifikation mit dem Alter zunimmt. Die Aktivität des Enzyms, das für die Ersetzung von G durch Q verantwortlich ist (McKinnon et al., 1978; Farkas and Jacobson, 1980), nimmt zu. Eine einheitliche Tendenz bei Modifikationen ist also nicht festzustellen.

Offen bleibt auch die Frage nach der Funktion dieser Modifikationen. In Temperatursprungexperimenten ist von Grosjean et al. (1978) die Stabilität von verschiedenen Anticodon-Anticodon-Interaktionen untersucht worden. Dabei stellte sich heraus, dass die Stabilität eines Q-U Basenpaares etwa drei Mal grösser ist als diejenige eines G-U Paares (Abb.29).

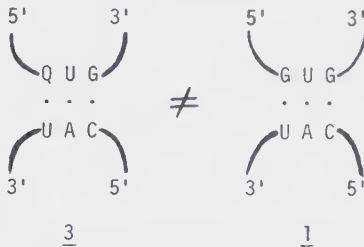


Abb. 29: Stabilisierung der Anticodon-Anticodon-Interaktion durch die Base Q

In einem in vitro-proteinsynthetisierenden System konnte jedoch gezeigt werden, dass tRNA<sup>His</sup> aus Kaninchen-Reticulocyten beide Histidin-Codonen (CAC und CAU) gleich gut übersetzen konnte, unabhängig davon, ob die Base Q anwesend war oder nicht (Mc Namara and Smith, 1978). Widerspiegelt das die Situation in vivo? Es ist jedenfalls nicht auszuschliessen, dass die gefundenen Modifikationen eine Adaptation an die Häufigkeit der verschiedenen Codonen, die übersetzt werden müssen, darstellen, wie das für die hintere Seidendrüse von *Bombyx mori* zur Zeit der Fibroinproduktion nachgewiesen ist (Chavancy and Daillie, 1971). Kürzlich ist auch von M.Bienz (persönliche Mitteilung) durch Injektion von TMV-RNA und tRNA<sup>Tyr</sup> von *Drosophila* in *Xenopus*-Oocyten gezeigt worden, dass die Base Q einen negativen Einfluss auf die Rate, mit der ein Stopcodon gelesen wird, haben kann.

## 8. Modifikationen auf der 3'-Seite des Anticodons

Ein hoher Gehalt an modifizierten Basen ist charakteristisch für tRNA. Mehr als 50 sind in ihrer Struktur aufgeklärt worden. Neben einfachen Methylierungen findet man auch sehr komplizierte Modifikationen wie ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A, i<sup>6</sup>A usw., wobei letztere vor allem auf der 3'-Seite des Antico-

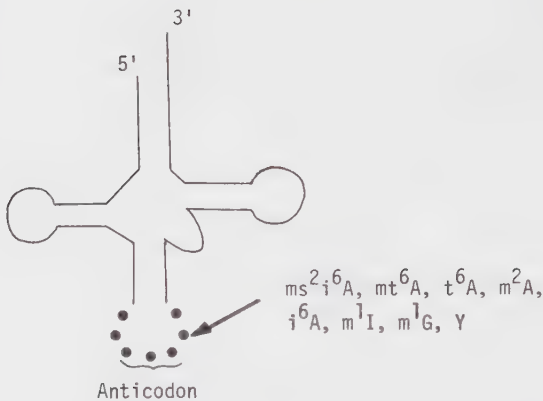


Abb. 30: Modifikationen auf der 3'-Seite des Anticodons

dons (Abb. 30) lokalisiert sind (Nishimura, 1979). Eine Aufstellung über die verschiedenen Modifikationen in Position 37 von einigen Organismen zeigt Tab. 4. Sieht man einmal von *Drosophila* ab, können folgende Feststellungen getroffen werden (Feldman, 1977; Nishimura, 1979):

- (a) handelt es sich um ein unmodifiziertes Nukleotid, so ist es immer ein A. Dies kommt nur vor bei tRNA's, die mit G beginnende Codonen übersetzen (Gly, Val, Glu, Ala)
- (b) ist ein A an der dritten Stelle des Anticodons, ist bei *E.coli* ein benachbartes  $ms^2i^6A$  zu finden, bei Hefe und Säugern ebenfalls meist ein hypermodifiziertes A
- (c) ebenfalls eine hypermodifizierte Base ist in Position 37 anzutreffen, wenn das Anticodon mit einem U endet
- (d) eine einfache Methylierung ( $m^2A$ ) findet man häufig bei tRNA's, deren Anticodon an der dritten Stelle ein G trägt

Ueber die Funktion dieser Modifikationen ist wenig bekannt. Einerseits stabilisieren sie die Codon-Anticodon-Interaktion (Grosjean et al., 1978), scheinen aber andererseits keine Bedeutung zu haben bei der Interaktion der tRNA's mit den entsprechenden Synthetasen, behalten sie doch ihre

| E. coli         | Hefe              | Säuger            | Bombyx            | Drosophila        | tRNA             | Codonen     |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------|
| A               | $\overset{1}{m}I$ | -                 | $\overset{1}{m}I$ | -                 | Ala              | GCN         |
| $m^2A$          | $A/t^6A$          | -                 | -                 | $\overset{1}{m}G$ | Arg              | CGN/AGA/AGG |
| $t^6A$          | -                 | $t^6A$            | -                 | $\overset{1}{m}G$ | Asn              | AAU/AAC     |
| $m^2A$          | $\overset{1}{m}G$ | -                 | -                 | -                 | Asp              | GAU/GAC     |
| $ms^2i^6A$      | $i^6A$            | -                 | -                 | nicht $i^6A$ *    | Cys              | UGU/UGC     |
| $m^2A$          | -                 | -                 | -                 | -                 | Gln              | CAA/CAG     |
| $m^2A$          | A                 | -                 | -                 | A                 | Glu              | GAA/GAG     |
| A               | A                 | A                 | A                 | A                 | Gly              | GGN         |
| $m^2A$          | -                 | -                 | -                 | $\overset{1}{m}G$ | His              | CAU/CAC     |
| $t^6A$          | -                 | -                 | -                 | -                 | Ile              | AUU/AUC/AUA |
| $ms^2i^6A$      | $\overset{1}{m}G$ | -                 | -                 | -                 | Leu              | UUA/UUG/CUN |
| $t^6A$          | $t^6A/t^6A$       | $ms^2i^6A/t^6A$   | -                 | $t^6A/m^1G$ **    | Lys              | AAA/AAG     |
| $t^6A$          | $t^6A$            | $t^6A$            | -                 | -                 | Met              | AUG         |
| A               | $t^6A$            | $t^6A$            | -                 | $t^6A$            | Met <sub>2</sub> | AUG         |
| $ms^2i^6A$      | Y                 | Y                 | $\overset{1}{m}G$ | $\overset{1}{m}G$ | Phe              | UUU/UUC     |
| -               | -                 | -                 | -                 | -                 | Pro              | CCN         |
| $ms^2i^6A/t^6A$ | $i^6A$            | $mt^6A/i^6A$      | $i^6A$ ****       | $i^6A$ *          | Ser              | UCN/AGU/AGC |
| $mt^6A$         | $t^6A$            | -                 | -                 | -                 | Thr              | ACN         |
| $ms^2i^6A$      | A                 | $\overset{1}{m}G$ | -                 | nicht $i^6A$ *    | Trp              | UGG         |
| $ms^2i^6A$      | $i^6A$            | -                 | -                 | nicht $i^6A$ ***  | Tyr              | UAU/UAC     |
| A               | A                 | A                 | -                 | A                 | Val              | GUN         |

Tab. 4: Modifikationen auf der 3'-Seite des Anticodons (nach Sprinzl et al., 1980)

\* White et al., 1975; \*\* White, 1975; \*\*\* Nishimura, 1972; \*\*\*\* Hentzen et al., 1976

Aminosäure-Akzeptoraktivität auch wenn die Y-Base oder eine Isopentenylgruppe entfernt wird (Feldman, 1977). Ob sie in diesem Zustand noch an der Proteinsynthese teilnehmen ist aber nicht sicher. Hall (1970) brachte diese Modifikationen mit der Bindung der tRNA ans Ribosom in Verbindung. Ferner ist von einer Suppressor-tRNA<sup>Tyr</sup> bekannt, dass das Fehlen von i<sup>6</sup>A zu einer reduzierten Suppressoreffizienz führt (Janner et al., 1978).

Einen Spezialfall scheint in dieser Hinsicht *Drosophila* darzustellen, sind doch die Hypermodifikationen meist durch einfache Methylierungen (immer m<sup>1</sup>G) ersetzt, ein Trend, der bei Hefe, Säugern und auch bei *Bombyx mori* nicht festzustellen ist, obwohl in allen drei Gruppen m<sup>1</sup>G neben dem Anticodon vorkommt. Bei *Bombyx* ist allerdings grosse Vorsicht geboten, sind doch erst wenige Sequenzen bekannt. Ueber die Bedeutung dieses ungewöhnlichen Befundes lässt sich noch kaum etwas aussagen. Der Umstand allerdings, dass sowohl *Drosophila*-tRNA als auch tRNA von Hefe in *Xenopus*-Oocyten aminoacyliert und in der Proteinsynthese gebraucht wird (nicht gezeigt), spricht nicht dafür, dass bei fehlender oder falscher Modifikation die Interaktion der tRNA mit dem Ribosom gestört ist.

## 9. Transfer RNA und Evolution

Schon um 1900 sind anhand kristallographischer Daten von Globin verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Organismen aufgezeigt worden (Jukes, 1966). In neuerer Zeit kamen Daten von interspezifischen DNA-Hybridisierungen, Kreuzreaktionen von Antiseren gegen spezifische Proteine, Aminosäurezusammensetzungen und Primärstrukturen von Proteinen dazu (Fitch and Margoliash, 1967). Mit den laufend vereinfachten DNA- und RNA-Sequenzierungsmethoden werden immer mehr Primärstrukturen bestimmt, die evolutiv interpretiert werden können. So sind Stammbäume abgeleitet worden für Cytochrom C und Globin, aber auch für 5sRNA, 16sRNA und tRNA's (Fitch and Margoliash, 1967; Cedergren, 1972; Denis and Wegnez, 1978; Larue et al., 1979; Cedergren et al., 1980; Fox et al., 1980).

In Hypothesen zur Evolution des Proteinsyntheseapparates wird häufig von einem einfacheren, weniger als die heute bekannten 20 Aminosäuren umfassenden System ausgegangen (Cedergren et al., 1980). Dillon (1978) postuliert eine Proto-tRNA, deren Abkömmlinge alle heutigen tRNA's seien. Ausgehend von einer Glycin-akzeptierenden "tRNA" sei auf protobiontischer

Stufe - parallel zur Entwicklung der verschiedenen Aminosäuren - der ganze Satz von verschiedenen tRNA's geschaffen worden, die dann ihrerseits unter Beibehaltung der Aminosäurespezifität zu pro- und eukaryontischen tRNA's evoluierten (Abb. 31).

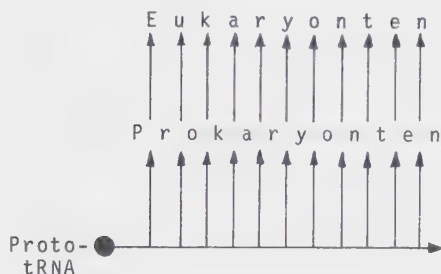


Abb. 31: Evolution von tRNA's (nach Dillon, 1978)

Dieses Modell hat für rezente tRNA's bedeutende Konsequenzen:

- (a) die erste Evolutionsstufe führt zu vier verwandten Gruppen (I bis IV) von tRNA's mit unterschiedlicher Akzeptoraktivität, entsprechend der hypothetischen Evolution der Aminosäuren
- (b) für eine bestimmte Aminosäure spezifische tRNA's sind näher verwandt zwischen Pro- und Eukaryonten als tRNA's mit unterschiedlicher Akzeptoraktivität innerhalb der Pro- oder Eukaryonten

Als Mass für eine Verwandtschaft wird die Anzahl unterschiedlicher Nukleotide (unter Vernachlässigung der Modifikationen) zwischen zwei tRNA's verwendet, wobei auch Lücken in eine Sequenz eingeführt werden können, um eine optimale Übereinstimmung zu erzielen (Cedergren, 1972; Sprinzl et al., 1980). Mit Hilfe eines Computerprogrammes sind evolutive Stammbäume für verschiedene tRNA-Familien aufgestellt worden (Larue et al., 1979; Cedergren et al., 1980). Sie unterstützen das Modell von Dillon, indem unter anderem für  $tRNA_{i}^{Met}$ ,  $tRNA^{Phe}$  und  $tRNA^{Gly}$  Sequenzhomologien auch zwischen Pro- und Eukaryonten gefunden wurden. Auch sehr frühe Ereignisse

scheinen sich noch verfolgen zu lassen, ist doch für  $\text{tRNA}_{\text{GAC}}^{\text{Val}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Gly}}$ , die beide zur Gruppe I von Dillon (siehe oben) gehören, eine gemeinsame Wurzel abgeleitet worden.

Was bisher an tRNA- und tRNA-Gen-Sequenzen von *Drosophila* bekannt ist (Sprinzl et al., 1980; Silverman et al., 1979; Hovemann et al., 1980) passt zusammen mit den in dieser Arbeit gefundenen Daten ausgezeichnet in das bestehende System hinein. Die nur partiell sequenzierten  $\text{tRNA}^{\text{Asn}}$ ,  $\text{tRNA}_{3\text{b}}^{\text{Val}}$  und die - soweit bekannt - mit  $\text{tRNA}_1^{\text{Gly}}$  von *Bombyx mori* (Garel and Keith, 1977; Züniga and Steitz, 1977) identische  $\text{tRNA}_3^{\text{Gly}}$  zeigen alle eine Homologie mit den Sequenzen von Säugern (Sprinzl et al., 1980).

Für  $\text{tRNA}^{\text{His}}$  sind lediglich drei Sequenzen bekannt, wobei erwartungsgemäss kaum Homologien feststellbar sind. Die Stammbäume für  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  und  $\text{tRNA}_{\text{i}}^{\text{Met}}$  sind von Larue et al. (1979) aufgestellt und diskutiert worden. Sowohl die Initiator-tRNA als auch  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  verändern die bestehenden Verhältnisse nicht.

Für  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$  und  $\text{tRNA}^{\text{Arg}}$  sind die Verwandtschaftsbeziehungen recht interessant. Sie sollen im folgenden etwas näher beleuchtet werden.

### 9.1. Transfer RNA<sup>Glu</sup>

Die in Tab. 5 zahlenmässig angegebenen Unterschiede zwischen verschiedenen  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$ -Sequenzen lassen eine eindeutige Gruppierung erkennen: Homologie innerhalb von *E. coli* und innerhalb der Eukaryonten, geringe Verwandtschaft jedoch zwischen Pro- und Eukaryonten. Die Verhältnisse können etwa durch folgenden Stammbaum wiedergegeben werden (Abb. 32):

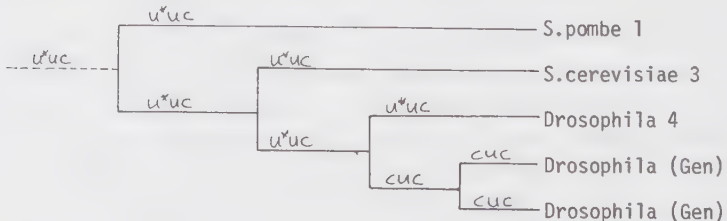


Abb. 32: Mögliche Evolution der  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$  von Eukaryonten

|   | Anti-<br>codon | A | B | C  | D  | E  | F  | G  |
|---|----------------|---|---|----|----|----|----|----|
| A | U*UC           | 0 | 1 | 30 | 32 | 29 | 35 | 36 |
| B | U*UC           |   | 0 | 30 | 32 | 29 | 35 | 36 |
| C | U*UC           |   |   | 0  | 18 | 18 | 21 | 22 |
| D | U*UC           |   |   |    | 0  | 21 | 28 | 29 |
| E | U*UC           |   |   |    |    | 0  | 6  | 7  |
| F | CUC            |   |   |    |    |    | 0  | 1  |
| G | CUC            |   |   |    |    |    |    | 0  |

Tab. 5: Sequenzunterschiede von tRNA<sup>Glu</sup> (nach Sprinzl et al., 1980)  
 A E.coli B<sub>1</sub>; B E.coli 2; C S.cerevisiae 3; D S.pombe 1  
 E Drosophila 4; F,G Drosophila (Gensequenzen nach Hosbach et al., 1980)

Auffälligstes Merkmal ist die offensichtlich erst sehr spät erfolgte Trennung zwischen U\*UC und CUC (siehe auch tRNA<sup>Lys</sup>). Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass die beiden Codonen für Glutaminsäure, GAA und GAG, von einer tRNA mit dem Anticodon UUC gelesen werden können (Crick, 1968), dass aber eine Aufspaltung in zwei Anticodonen eine effizientere Translation erlaubt. Parallel dazu könnte auch die Modifikation des U in der Wobble-Position des Anticodons entwickelt worden sein, was eine Beschränkung auf GAA-Codonen mit sich brachte (Kobayashi et al., 1974). Genauer wird sich aber erst sagen lassen, wenn mehr eukaryontische tRNA<sup>Glu</sup>-Sequenzen bekannt sind.

## 9.2. Transfer RNA<sup>Lys</sup>

Analoge Verhältnisse sind auch für tRNA<sup>Lys</sup> feststellbar (Tab. 6 und Abb. 33). Hier sind ebenfalls die tRNA's mit den zwei Anticodonen CUU und U\*UU innerhalb der höheren Eukaryonten näher miteinander verwandt als die tRNA's mit dem gleichen Anticodon zwischen Hefe und höheren Eukaryonten. Dies deutet auch darauf hin, dass das ursprünglichere Codon UUU gewesen ist, das die beiden Codonen für Lysin, AAA und AAG, gleichzeitig übersetzen konnte. Im Verlauf der Evolution wären dann mehr als ein Mal die Mutation zu CUU (nicht letal, sofern mindestens zwei Gene vorhanden sind) und parallel dazu die Modifikation des U in der Wobble-Position erfolgt.

| Anti-codon | A | B  | C  | D  | E  | F  | G  | H  | I  |
|------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A U*UU     | 0 | 14 | 28 | 26 | 27 | 26 | 27 | 26 | 27 |
| B U*UU     |   | 0  | 26 | 27 | 21 | 21 | 21 | 19 | 21 |
| C CUU      |   |    | 0  | 19 | 19 | 22 | 22 | 25 | 21 |
| D U*UU     |   |    |    | 0  | 24 | 23 | 23 | 24 | 23 |
| E CUU      |   |    |    |    | 0  | 2  | 0  | 13 | 0  |
| F CUU      |   |    |    |    |    | 0  | 2  | 12 | 2  |
| G CUU      |   |    |    |    |    |    | 0  | 10 | 0  |
| H U*UU     |   |    |    |    |    |    |    | 0  | 12 |
| I CUU      |   |    |    |    |    |    |    |    | 0  |

Tab. 6: Sequenzunterschiede von tRNA<sup>Lys</sup> (nach Sprinzl et al., 1980)  
 A E.coli; B B.subtilis; C S.cerevisiae haploid; D S.cerevisiae 2; E Drosophila 2; F-H Kaninchenleber 1, 2 und 3;  
 I Maus-Fibroblasten

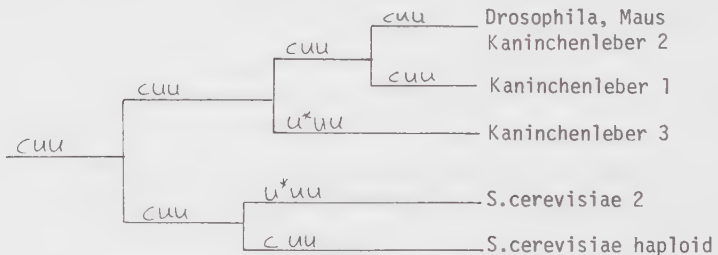


Abb. 33: Mögliche Evolution der tRNA<sup>Lys</sup> von Eukaryonten

### 9.3. Transfer RNA<sup>Arg</sup>

Von ganz besonderem Interesse ist die Arginin-Familie, sind es doch 6 Codonen, die für diese Aminosäure codieren. Nach der Theorie von Dillon (1978) kommen tRNA<sup>Arg</sup> in den Gruppen II (mit C beginnende Codonen) und III (mit A beginnende Codonen) vor. Das müsste sich auch in den Sequenzunterschieden niederschlagen, besagt doch die Theorie, dass tRNA<sup>Arg</sup> zweimal auf unabhängigem Weg entstanden ist. Betrachtet man die Sequenzunterschiede (Tab. 7) und die mögliche Evolution dieser tRNA's (Abb. 34),

| Anti-codon | A | B | C  | D  | E  | F  | G  |
|------------|---|---|----|----|----|----|----|
| A ICG      | 0 | 2 | 41 | 34 | 39 | 37 | 37 |
| B ICG      |   | 0 | 39 | 35 | 40 | 38 | 35 |
| C N*CU     |   |   | 0  | 35 | 38 | 39 | 33 |
| D ICG      |   |   |    | 0  | 26 | 26 | 17 |
| E U*CU     |   |   |    |    | 0  | 2  | 17 |
| F U*CU     |   |   |    |    |    | 0  | 19 |
| G ACG      |   |   |    |    |    |    | 0  |

Tab. 7: Sequenzunterschiede von tRNA<sup>Arg</sup> (nach Sprinzl et al., 1980)  
 A E.coli 1; B E.coli 2; C Phage T<sub>4</sub>; D S.cerevisiae 2;  
 E S.cerevisiae 3a; F S.cerevisiae 3b; G Drosophila 2 (Gen-  
 sequenz, Silverman et al., 1979)

so scheint sich diese Vermutung zu bestätigen. Für eine endgültige Interpretation sind jedoch eindeutig zu wenig Sequenzen verfügbar.

#### 9.4. Konvergente Entwicklungen

Alle Versuche, evolutive Stammbäume abzuleiten, basieren auf der divergenten Entwicklung der betrachteten Merkmale. In Anpassung an Umweltbedingungen kann es jedoch häufig zu Konvergenzen kommen, die eine nähere Verwandtschaft vortäuschen. Daneben kann auch eine zufällige Fluktuation eine phylogenetische Verwandtschaft verwischen. Es ist deshalb aufgrund des sehr beschränkten Datenmaterials schwierig zu entscheiden, ob die abgeleiteten Verwandtschaften der Wirklichkeit entsprechen. Folgende

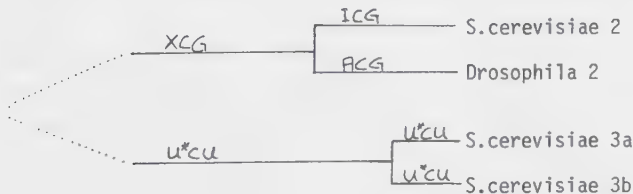


Abb. 34: Mögliche Evolution der tRNA<sup>Arg</sup> von Eukaryonten

Fakten mögen dies illustrieren:

- (a) im Stammbaum für tRNA<sup>Phe</sup> (Cedergren et al., 1980) liegt *Euglena* (ein Flagellat) sehr nahe bei den höheren Pflanzen und Säugern
- (b) eine ausserordentlich grosse Homologie zwischen tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ile</sup> und tRNA<sup>Lys</sup> von *Drosophila melanogaster* ist von Hovemann et al. (1980) gefunden worden. Reflektiert dies eine phylogenetische Verwandtschaft wie das nach Dillon (1978) zu erwarten wäre (alle diese drei tRNA's gehören in die Gruppe III, müssten also verwandt sein), oder handelt es sich um eine konvergente Entwicklung?

Erstaunlich ist, dass eine konvergente Entwicklung zufällig gerade drei tRNA's der gleichen Gruppe von Dillon betreffen sollte. Andererseits ist ein solches Ausmass an Homologie noch nirgends zwischen verschiedenen tRNA's gefunden worden. Die Verwandtschaft zwischen tRNA<sup>Gly</sup> und tRNA<sup>Val</sup> (Cedergren et al., 1980) ist lange nicht so ausgeprägt. Oder hat da der Zufall mitgespielt?

#### 9.5. Konstanz von tRNA-Sequenzen bei Eukaryonten

Beim Vergleich von tRNA's und tRNA-Genen von verschiedenen Organismen besonders auffallend ist die grosse Sequenzkonstanz innerhalb der Eukaryonten (Tab. 5,6 und 7; Sprinzl et al., 1980). So sind die entsprechenden tRNA<sup>Lys</sup> von *Drosophila* und Säugern (Maus, Kaninchen) völlig identisch, obwohl paläontologische Daten zeigen, dass eine evolutive Trennung vor mindestens 500 Millionen Jahren erfolgt sein dürfte. Auch tRNA<sup>Phe</sup> zeigt lediglich zwei Nukleotidunterschiede zwischen *Drosophila* und Säugern.

Auch innerhalb einer einzelnen Art scheinen die redundanten tRNA-Gene kaum zu divergieren. So haben Hovemann et al. (1980) auf dem Plasmiden pCIT12 je drei tRNA<sup>Lys</sup>- resp. tRNA<sup>Asn</sup>-Gene gefunden, deren codierende Sequenzen identisch sind. Ähnliche Verhältnisse sind für tRNA<sup>Met</sup> ebenfalls bei *Drosophila* nachgewiesen worden, wobei sich die Gene jedoch in einem Nukleotid von der cytoplasmatischen tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub> unterscheiden (D. Söll, persönliche Mitteilung). Für tRNA<sup>Glu</sup><sub>CUC</sub> von *Drosophila* existieren mindestens vier identische und ein durch eine einzige Mutation verändertes Gen (Hosbach et al., 1980).

Kubli (1980) postuliert einen Korrekturmechanismus, durch den die redundanten Sequenzen konstant gehalten werden, wobei die damit verbundene evolutive Restriktion durch grössere Plastizität bei der Modifikation von tRNA's aufgehoben würde. Das bringt auch den Vorteil mit sich, dass die Selektion nur an einem Gen, dem Modifikationsenzym-Gen, ansetzen müsste. Sowohl die hier gefundenen partiellen Modifikationen von tRNA<sup>Phe</sup> und von tRNA<sup>Glu</sup> als auch der Umstand, dass sich tRNA<sup>His</sup><sub>γ</sub> und tRNA<sup>His</sup><sub>δ</sub> wahrscheinlich lediglich im Nukleotid Q unterscheiden, stützen diese Hypothese.

Ungeklärt ist jedoch die Natur des potentiellen Korrekturmechanismus. Die bisher vorgeschlagenen Modelle (Callan, 1967; Edelman and Gally, 1970; Smith, 1973) scheinen alle ein nahes Beieinanderliegen der Gene zu bedingen; dies ist jedoch bei *Drosophila*-Genen nicht der Fall (Kubli, 1980). Entweder evolvieren die verschiedenen tRNA-Genclusters unabhängig voneinander, oder aber sie liegen in der Keimbahn beieinander und werden durch ähnliche Prozesse wie die Immunoglobuline (Tonegawa et al., 1977) im Soma umverteilt. Versuche von Dudler (1981) ergaben jedoch keine unterschiedliche Genanordnung in Soma und Keimbahn. Erst kürzlich sind bei *Schizosaccharomyces pombe* Hinweise darauf gefunden worden, dass "heterologe Rekombination" bei der Konstanthaltung der Sequenzen von multigenen Familien auch zwischen verschiedenen Chromosomen eine wichtige Rolle spielen könnte (Kohli et al., 1980).

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Transfer RNA's von *Drosophila melanogaster* (Stamm Oregon) wurden mit verschiedenen Methoden isoliert und charakterisiert.

1. Transfer RNA<sub>2</sub><sup>Phe</sup>, isoliert durch Affinitätschromatographie auf einer Säule mit matrixgebundener tRNA<sub>E.coli</sub><sup>Glu</sup>, konnte durch Chromatographie auf RPC-5 bei pH 3,8 in vier Isoakzeptoren aufgetrennt werden.
2. Durch Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass sich diese vier Isoakzeptoren lediglich im Ausmass der Modifikation in den Positionen 32 (C-C<sup>m</sup>) und 47 (U-D) unterscheiden.
3. Durch Chromatographie auf RPC-5 wurde die Veränderung des Ausmasses der Methylierung in Position 32 während Entwicklung und Alterung untersucht.
4. Transfer RNA<sub>4</sub><sup>Glu</sup> wurde mittels Affinitätschromatographie auf einer Säule mit matrixgebundener tRNA<sub>Hefe</sub><sup>Phe</sup> isoliert und anschliessend sequenziert. Position 32 zeigt die gleiche partielle Modifikation (C-C<sup>m</sup>) wie bei tRNA<sub>2</sub><sup>Phe</sup>.
5. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und RPC-5 - Chromatographie wurden tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, tRNA<sub>2</sub><sup>Arg</sup>, tRNA<sub>3</sub><sup>Gly</sup> und tRNA<sub>5</sub><sup>Ala</sup> gereinigt.
6. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese von vorfraktionierter tRNA wurden tRNA<sup>Ser</sup> und tRNA<sup>Asn</sup> isoliert.
7. Die Sequenzen von tRNA<sup>His</sup> und tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> wurden bestimmt.
8. Transfer RNA<sub>2</sub><sup>Arg</sup>, tRNA<sub>3</sub><sup>Gly</sup>, tRNA<sub>3b</sub><sup>Val</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> und tRNA<sup>Asp</sup> wurden partiell sequenziert.
9. Es konnte ein gehäuftes Auftreten von m<sup>1</sup>G auf der 3'-Seite der Anticodonen von *Drosophila*-tRNA's festgestellt werden.
10. Die Hypothese zur Evolution von tRNA's von Dillon (1978) wird diskutiert.

## VI. ABKÜRZUNGEN

|                  |                                                                                     |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| tRNA             | transfer Ribonukleinsäure                                                           |
| mRNA             | messenger Ribonukleinsäure                                                          |
| rRNA             | ribosomale Ribonukleinsäure                                                         |
| RNase            | Ribonuklease                                                                        |
| DEAE             | Diäthylaminoäthan                                                                   |
| EDTA             | Aethylendiamintetraessigsäure (Titriplex III)                                       |
| HEPES            | N-Hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsäure                                        |
| TEAB             | Triäthylammonium-bicarbonat                                                         |
| RPC              | Reversed phase Chromatographie                                                      |
| UV               | ultraviolettes Licht                                                                |
| A <sub>260</sub> | Absorption bei 260 Nanometern<br>eine A <sub>260</sub> -Einheit entspricht 40µg RNA |
| blue, XCFE       | Xylencyanol FF (Farbmarker: blau)                                                   |
| yellow           | Orange G (Farbmarker: gelb)                                                         |
| pink             | Säurefuchsin (Farbmarker: rosa)                                                     |

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Altman, S. and Smith J.D. (1971). Tyrosine tRNA precursor molecule polynucleotide sequence.  
Nature New Biol. 233, 35-39.
- Altwegg, M. (1977). Isolation und partielle Sequenzierung von tRNA<sup>Glu</sup> und tRNA<sup>Phe</sup> von *Drosophila melanogaster*.  
Diplomarbeit, Universität Zürich.
- Altwegg, M., Vögeli, G. und Kubli, E. (1978). Isolation und partielle Sequenzierung von tRNA<sup>Glu</sup> von *Drosophila melanogaster*.  
Rev. suisse Zool. 85, 5-9.
- Blatt, B. and Feldmann, H. (1973). Characterization of precursors to tRNA in yeast.  
FEBS letters 37, 129-132.
- Brownlee, G.G. (1972). Determination of sequences in RNA.  
North-Holland/American Elsevier, Amsterdam/New York.
- Callan, H.G. (1967). The organization of genetic units in chromosomes.  
J. Cell Sci. 2, 1-7.
- Cedergren, R.J. (1972). On the phylogeny of tRNA's.  
J. theor. Biol. 37, 209-220.
- Cedergren, R.J., LaRue, B., Sankoff, D., Lapalme, G. and Grosjean H. (1980).  
Convergence and minimal mutation criteria for evaluating early events in tRNA evolution.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 2791-2795.
- Chavancy, G. and Daillie, J. (1971). Adaptation fonctionnelle des tRNAs à la biosynthèse protéique dans un système cellulaire hautement différencié.  
Biochimie 53, 1187-1194.
- Cortese, R. (1979). The role of tRNA in regulation, in: Biological Regulation and Development, vol. 1: Gene Expression (R.R. Goldberger, editor), New York

- Crick, F.H.C. (1966). Codon-Anticodon pairing: The wobble hypothesis.  
J. Mol. Biol. 19, 548-555.
- Crick, F.H.C. (1968). The origin of the genetic code.  
J. Mol. Biol. 38, 367-379.
- Dahlberg, J.E., Sawyer, R.C., Taylor, S.M., Faras, A.J., Levinson, W.E.,  
Goodman, H.M. and Bishop, J.M. (1974). Transcription of DNA from the  
70s RNA of Rous Sarcoma virus. Identification of a specific 4s RNA  
which serves as primer.  
J. Virol. 13, 1126-1139.
- Denis, H. and Wegnez, M. (1978). Evolution of the 5s RNA genes in vertebrates.  
J. Mol. Evol. 12, 11-15.
- Deutscher, M.P., Foulds, J., Morse, J.M. and Hilderman, R.H. (1974). Synthe-  
sis of the CCA-terminus of transfer RNA.  
Brookhaven Symposia in Biology 26, 126-137.
- Deutch, C.E., Scarpulla, R.C., Sonnenblick, E.B. and Soffer, R.L. (1977).  
Pleiotropic phenotype of an E.coli mutant lacking leucyl-, phenylala-  
nyl-transfer ribonucleic acid - protein transferase.  
J. Bacteriol. 129, 544-553.
- Dillon, L.S. (1978). The genetic mechanism and the origin of life.  
Plenum Press, New York and London.
- Dudler, R., Egg, A.H., Kubli, E., Artavanis-Tsakonas, S., Gehring, W.J.,  
Stewart, R. and Schedl, P. (1980). Transfer RNA genes of Drosophila.  
NucL. Ac. Res. 8, 2921-2937.
- Dudler, R. (1980). Dissertation, Universität Zürich (in Vorbereitung).
- Dunn, R., Addison, W.R., Gillam, I.C. and Tener, G.M. (1978). The purifi-  
cation of valine tRNAs of Drosophila melanogaster.  
Can. J. Biochem. 56, 618-623.
- Edelman, G.M. and Gally, J.A. (1970). Arrangement and evolution of eucaryo-  
tic genes, in: The Neurosciences. G.C. Quarten, T. Melnechuk and G.  
Adelman (editors), Rockefeller University Press, New York.
- Egg, A. (1978). Eine vergleichende Analyse der tRNA und 5s RNA bei der Le-  
talmutante 1(3)tr und dem Wildtyp von Drosophila melanogaster.  
Dissertation, Universität Zürich.

- Farkas, W.R. and Jacobson, K.B. (1980). Transfer RNA-Guanine transglycosylase and guanine-accepting transfer RNA's of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* 10, 183-188.
- Feldman, M.Y. (1977). Minor components in transfer RNA: The location-function relationships. *Progr. Biophys. Molec. Biol.* 32, 83-102.
- Fitch, W.M. and Margoliash, E. (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science* 155, 279-284.
- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N. and Woese, C.R. (1980). The phylogeny of procaryotes. *Science* 209, 457-463.
- Gallant, J. and Lazzarine, R.A. (1976). The stringent control, in: *Protein Synthesis. A Series of Advances*, vol. 2 (E.H. McConkey, editor), Marcel Dekker, New York.
- Garel, J.P. and Keith, G. (1977). Nucleotide sequence of *Bombyx mori* L. tRNA<sup>Gly</sup><sub>1</sub>. *Nature* 269, 350-352.
- Gentner, H. and Berg, P. (1971). Occurrence of a glycyI-lipopolysaccharide structure in *E.coli* and its enzymatic formation from glycyI-tRNA. *Fed. Proc.* 30: 1218 (abstract).
- Grigliatti, T.A., White, B.N., Tener, G.M., Kaufmann, T.C., Holden, J.J. and Suzuki, D.T. (1973). Studies on the transfer RNA genes of *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38, 461-474.
- Grosjean, H., Takada, C. and Pêtre, J. (1973). Complex formation between transfer RNAs with complementary anticodons: Use of matrix bound tRNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 53, 882-893.
- Grosjean, H., deHenau, S. and Crothers, D.M. (1978). On the physical basis for ambiguity in genetic coding interactions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 610-613.

- Gupta, R.C. and Randerath, K. (1979). Rapid print-readout technique for sequencing of RNA's containing modified nucleotides.  
Nucl. Ac. Res. 6, 3443-3458.
- Hall, R.H. (1970). N<sup>6</sup>-(<sup>2</sup>-isopentenyl)adenosine: Chemical reactions, biosynthesis, metabolism, and significance to the structure and function of tRNA.  
Progr. nucleic Acids Res. molec. Biol. 10, 57-68
- Hamilton, T.A. and Litt, M. (1976). Biosynthesis of mammalian transfer RNA. Evidence for regulation by deacylated transfer RNA.  
Biochim. Biophys. Acta 435, 362-375.
- Harada, F. and Dahlberg, J.E. (1975). Specific cleavage of tRNA by nucle-  
ase S<sub>1</sub>.  
Nucl. Ac. Res. 2, 865-871.
- Haseltine, W.A., Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977). Rous sarcoma virus genome is terminally redundant. The 5' sequence.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 989-992.
- Hentzen, D., Garel, J.P. and Keith, G. (1976). Anticodon loop sequences of transfer RNA<sup>Ser</sup><sub>CGA</sub> and transfer RNA<sup>Ser</sup><sub>IGA</sub> from the posterior silk gland of *Bombyx mori* L.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 71, 241-248.
- Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R. and Zamir, A. (1965). Structure of a ribonucleic acid.  
Science 147, 1462-1465.
- Holmes, W.M., Hurd, R.E., Reid, B.R., Rimerman, R.A. and Hatfield, G.W. (1975). Separation of transfer ribocucleic acid by sepharose chromatography using reverse salt gradients.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1068-1071.
- Hosbach, H. (1977). Vergleich der Aminoacylierung und der Isoakzeptoren-muster der tRNA junger und alter Fliegen von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Zürich.
- Hosbach, H.A. and Kubli, E. (1979). Transfer RNA in ageing *Drosophila*:  
II. Isoacceptor patterns.  
Mech. Ageing Dev. 10, 141-149.

- Hosbach, H.A., Silberklang, M. and McCarthy, B.J. (1980). Evolution of a *Drosophila melanogaster* glutamate tRNA gene cluster.  
Cell, in press
- Hovemann, B., Sharp, S., Yamada, H. and Söll, D. (1980). Analysis of a *Drosophila* tRNA gene cluster.  
Cell 19, 889-895.
- Jacq, C., Miller, J.R. and Brownlee, G.G. (1977). A Pseudogene structure in 5s DNA of *Xenopus laevis*.  
Cell 12, 109-120.
- Janner, F., Vögeli, G. and Flury, R. (1978). The effect of an antisuppressor on tRNA in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.  
Experientia 34: 943 (abstract).
- Jukes, T.H. (1966). Molecules and Evolution.  
Columbia University Press, New York and London.
- Keith, G. and Dirheimer, G. (1980). Primary structure of *Bombyx mori* posterior silk gland tRNA<sup>Phe</sup>.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 92, 109-115.
- Kern, H. (1975). Fractionation of nucleic acids with special regard to rapidly labeled RNA.  
Anal. Biochem. 67, 147-156.
- Kersten, H. (1980). Role of modified nucleosides in tRNA-ribosome interaction.  
EMBO-FEBS tRNA workshop (abstract).
- Kirby, J.D. (1956). A new method for the isolation of ribonucleic acids for mammalian tissues.  
Biochem. J. 64, 405-408.
- Kobayashi, T., Irie, T., Yoshida, T., Takeishi, K. and Ukita, T. (1974). The primary structure of yeast glutamic acid tRNA specific to the GAA codon.  
Biochim. Biophys. Acta 366, 168-181.
- Kohli, J., Munz, P. and Leupold, U. (1980). Opal suppressors of *Schizosaccharomyces pombe* and their use for the study of the mechanisms of sequence conservation among redundant tRNA genes.  
EMBO-FEBS tRNA workshop (abstract).

- Kuchino, Y. and Borek, E. (1978). Tumour-specific phenylalanine tRNA contains two supernumerary methylated bases.  
*Nature* 271, 126-129.
- Kubli, E. (1978). Der Letalfaktor 1(2)me von *Drosophila melanogaster*: eine Deletion für tRNS Gene?  
*Rev. suisse Zool.* 85, 790-795.
- Kubli, E. (1980). Modification of transfer RNA in eucaryotes: an evolutionary interpretation.  
*Trends Biochem. Sci.* April, 90-91.
- Kubli, E. and Schmidt, T. (1978). The localization of tRNA<sup>Glu</sup><sub>4</sub> genes from *Drosophila melanogaster* by "in situ" hybridization.  
*Nucl. Ac. Res.* 5, 1465-1478.
- La Rossa, L. and Söll, D. (1978). Other roles of tRNA, in: *Transfer RNA* (S. Altman, editor), MIT Press, Cambridge and London.
- LaRue, B., Cedergren, R., Sankoff, D. and Grosjean, H. (1979). Evolution of phenylalanine and methionine initiator transfer RNA's.  
*J. Mol. Evol.* 14, 287-300.
- Lindsley, D.L. and Grell, E.H. (1972). Genetic variations of *Drosophila melanogaster*.  
*Carn. Inst. Wash.*, publ. 627.
- Lindsley, D.L., Sandler, L., Baker, B.S., Carpenter, A.T.C., Denell, R.E., Hall, J.C., Jacobs, P.S., Midos, G.L.C., Davis, B.K., Gethmann, R.C., Hary, R.W., Hessler, A., Miller, S.M., Nozawa, H., Perry, D.M. and Gould-Somero, M. (1972). Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the *Drosophila* genome.  
*Genetics* 71, 157-184.
- Madison, J.T. and Boguslawski, S.J. (1974). Partial digestion of a yeast lysine transfer RNA and reconstruction of the nucleotide sequence.  
*Biochemistry* 13, 524-527.
- Männlein, E., Praisler, R., Dingermann Th., Pistel, F. and Kersten, H. (1980). Functional role of ribothymidine in tRNA function.  
 EMBO-FEBS tRNA workshop (abstract).

- Mc Kinnon, R.D., Wosnick, M.A. and White, B.N. (1978). The role of guanine insertion enzyme in Q-biosynthesis in *Drosophila melanogaster*.  
NucL. Ac. Res. 5, 4865-4876.
- Matouschek, M. (1979). Untersuchungen über den Einbau von ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphat in die niedermolekulare RNS von vier *Drosophila melanogaster* Zelllinien.  
Diplomarbeit, Universität Zürich.
- Mazabraud, A. (1979). Deficiency of the peroxy-Y-base in oocyte phenylalanine tRNA.  
FEBS letters 100, 235-240.
- Mazabraud, A. and Garel, J.P. (1979). Analysis of tRNA population from *Drosophila melanogaster* by means of polyacrylamide gel mapping.  
FEBS letters 105, 70-76.
- Messenguy, F. and Delforge, J. (1976). Role of tRNA's in the regulation of several biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.  
Eur. J. Biochem. 67, 335-339.
- Mc Namara, A.L. and Smith, D.W.E. (1978). The function of the histidine tRNA isoaccepting species in hemoglobin synthesis.  
J. Biol. Chem. 253, 5964-5970.
- Nesbitt, J.A. and Lennarz, W.J. (1968). Participation of aminoacyl-tRNA in aminoacylphosphatidylglycerol synthesis.  
J. Biol. Chem. 243, 3088-3095.
- Nishimura, S. (1972). Minor components in transfer RNA: Their characterization, location and function.  
Progr. Nucl. Acids Res. molec. Biol. 12, 49-85.
- Nishimura, S. (1978). Modified nucleosides and isoaccepting tRNA, in: Transfer RNA (S. Altman, editor), MIT Press, Cambridge and London.
- Nishimura, S. (1979). Modified nucleosides in tRNA, in: Transfer RNA: Structure, Properties and Recognition (P.R. Schimmel, D. Söll, J.N. Abelson, editors), Cold Spring Harbor Laboratory.
- Nöthiger, R. and Labhart, C. (1980). A self amplifying system for mass collection of unfertilized eggs.  
Dros. Inf. Service, in press.

- Okada, N., Shindo-Okada, N. and Nishimura, S. (1977). Isolation of mammalian tRNA<sup>Asp</sup> and tRNA<sup>Tyr</sup> by lectin-sepharose affinity column chromatography.  
Nucl. Ac. Res. 4, 415-423.
- Olexa, S.A. (1977). Characterization of a high molecular weight complex of aminoacyl-tRNA-synthetases in *Drosophila melanogaster*.  
Ph.D. thesis, Temple University, Philadelphia.
- Pearson, R.L., Weiss, J. and Kelmers, A.D. (1971). Improved separation of transfer RNA's on polychlorotrifluoroethylene-supported reversed phase chromatography columns.  
Biochim. Biophys. Acta 228, 770-774.
- Pearson, R.L., Hancher, C.W., Weiss, J.F., Holladay, D.W. and Kelmers, A.D. (1973). Preparation of crude transfer RNA and chromatographic purification of five transfer RNA's from calf liver.  
Biochim. Biophys. Acta 294, 236-249.
- Peattie, D.A. (1979). Direct chemical method for sequencing RNA.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1760-1764.
- Perry, R.P. (1976). Processing of RNA.  
Ann. Rev. Biochem. 45, 605-629.
- Roberts, R.J. (1972). Structure of two glycyl-tRNA's from *Staphylococcus epidermidis*.  
Nature New Biol. 237, 44-52.
- Sakano, H. and Shimura, Y. (1975). Sequential processing of precursor tRNA molecules in *E.coli*.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3369-3373.
- Schedl, P. and Primakoff, P. (1973). Mutants of *E.coli* thermosensitive for the synthesis of transfer RNA.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2091-2095.
- Schmidt, T. (1980). Lokalisation von transfer RNA Genen durch "in situ"-Hybridisierung bei *Drosophila melanogaster*.  
Dissertation, Universität Zürich.
- Schmidt, T., Egg, A.H. and Kubli, E. (1978). The localization of tRNA<sup>Asp</sup><sub>2</sub> genes from *Drosophila melanogaster* by "in situ" hybridization.  
Molec. gen. Gen. 164, 249-254.

- Silberklang, M., Gillum, A.M. and RajBhandary, U.L. (1979). Use of in vitro  $^{32}\text{P}$  labeling in the sequence analysis of nonradioactive tRNA's. *Methods in Enzymology*, Vol. LIX, part G, pp. 58-109.
- Silverman, S., Gillam, I.C., Tener, G.M. and Söll, D. (1979). The nucleotide sequence of lysine tRNA<sub>2</sub> from *Drosophila*. *Nucl. Ac. Res.* 6, 435-442.
- Silverman, S., Heckman, J., Cowling, G.J., Delaney, A.D., Dunn, R.J., Gillam, I.C., Tener, G.M., Söll, D. and RajBhandary, U.L. (1979). The nucleotide sequence of the initiator tRNA from *Drosophila*. *Nucl. Ac. Res.* 6, 421-433.
- Silverman, S., Schmidt, O., Söll, D. and Hovemann, B. (1979). The nucleotide sequence of a cloned *Drosophila* arginine tRNA gene and its in vitro transcription in *Xenopus* germinal vesicle extracts. *J. Biol. Chem.* 254, 10290-10294.
- Singer, C.E., Smith, G.R., Cortese, R. and Ames, B.N. (1972). Mutant tRNA<sup>His</sup> ineffective in repression and lacking two pseudouridine modifications. *Nature New Biol.* 238, 72-74.
- Smith, G.P. (1973). Unequal crossover and the evolution of multigene families. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38, 507-513.
- Söll, D. (1971). Enzymatic modification of transfer RNA. *Science* 173, 293-299.
- Sprinzi, M., Grueter, F., Spelzhaus, A. and Gauss, D.H. (1980). Compilation of tRNA sequences. *Nucl. Ac. Res.* 8, r1-r21.
- Stanley, J. and Vassilenko, S. (1978). A different approach to RNA sequencing. *Nature* 274, 87-89.
- Stewart, T.S., McCutchan, T., Vögeli, G. and Söll, D. (1976). The isolation of specific tRNA precursors, in: *Synthesis, Structure and chemistry of Transfer Ribonucleic Acids and their Components* (M. Wieworsky, editor), Polish Academy of Sciences, Poznan.

- Tanaka, Y., Dyer, T.A. and Brownlee, G.G. (1980). An improved direct sequence method: its application to vicia faba 5,8s ribosomal RNA. *Nucl. Ac. Res.* 8, 1259-1272.
- Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N. and Pirotta, V. (1977). Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 921-931.
- Vögeli, G., Grosjean, H. and Söll, D. (1975). A method for the isolation of specific tRNA precursors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4790-4794.
- White, B.N. (1975). Studies on lysine, glutamine and glutamic acid tRNA's from *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta* 395, 322-328.
- White, B.N. and Tener, G.M. (1973). Chromatography of *Drosophila* tRNA on BD-cellulose. *Can. J. Biochem.* 51, 896-902.
- White, B.N. and Tener, G.M. (1973). Properties of tRNA<sup>Phe</sup> from *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta* 312, 267-275.
- White, B.N., Tener, G.M., Holden, J. and Suzuki, D.T. (1973). Analysis of tRNA's during the development of *Drosophila*. *Devel. Biol.* 33, 185-195.
- White, B.N., Tener, G.M., Holden, J. and Suzuki, D.T. (1973). Activity of a tRNA modifying enzyme during the development of *Drosophila* and its relationship to the su(s) locus. *J. Mol. Biol.* 74, 635-651.
- White, B.N., Dunn, R., Gillam, I.C., Tener, G.M., Armstrong, D.J., Skoog, F., Frihart, C.R. and Leonard, N.J. (1975). An Analysis of five serine transfer ribonucleic acids from *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 250, 515-521.
- Yen, P.H., Sodja, A., Cohen, M., Conrad, S.E., Davidson, N. and Ilgen, C. (1977). Sequence arrangement of tRNA genes on a fragment of *Drosophila melanogaster* DNA cloned in *E.coli*. *Cell* 11, 763-777.

- Zimm, G.G. and Lindsley, D.L. (1976). Biochemical mutants of *Drosophila melanogaster*, in: Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 2, pp. 848-855, CRC Press, Cleveland.
- Züblin, E. (1980). Reinigung und Charakterisierung einer potentiellen Suppressor-transfer-RNA aus dem Stamm Su(dx) von *Drosophila melanogaster*.  
Diplomarbeit, Universität Zürich.
- Zùniga, M.C. and Steitz, J.A. (1977). The nucleotide sequence of a major glycine transfer RNA from the posterior silk gland of *Bombyx mori* L. *Nucl. Ac. Res.* 4, 4175-4196.

## C U R R I C U L U M   V I T A E

von Martin Altwegg, geboren am 12. Oktober 1952 in  
Zürich, Bürger von Wädenswil (ZH) und Guntershausen (TG).

- |             |                                                                                                                                       |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1968 - 1972 | Wirtschaftsgymnasium<br>Kantonschule Zürcher Oberland, Wetzikon                                                                       |
| 1972 - 1977 | Biologiestudium an der Universität Zürich<br>Hauptfach: Zoologie<br>Nebenfächer: Mathematik, Chemie, Botanik<br>und Molekularbiologie |
| 1977 - 1980 | Assistent am Zoologischen Institut der<br>Universität Zürich                                                                          |

Während meiner Studien an der Universität Zürich besuchte  
ich Vorlesungen und Kurse folgender Dozenten:

Bachofen, Baker, Batschelet, Baumann, Biegert, Billeter,  
Birnstiel, Briegel, Burla, Chen, Clarkson, Cook, Deäk,  
Egger, Endress, Eugster, Fischer, Glaser, Hediger, Honeg-  
ger, Humbel, Jungen, Jungen-Hauschteck, Kägi, Kramer,  
Kubik, Kubli, Kuhn-Schnyder, Kummer, Kurt, Leemann, Melli,  
Nievergelt, Nöthiger, Oswald, Rast, Rohweder, Schaffner,  
Schäppi, Scheffrahn, Schlittler, Schmid, Tardent, Wanner,  
Weber, Wehner, Weissmann, Ziswiler.

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von  
PD Dr. E. Kubli.





